



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Niveles séricos elevados de los aminoácidos alifáticos de cadena ramificada inducen inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial

TESIS DOCTORAL

OLHA ZHENYUKH

MADRID, 2017



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Niveles séricos elevados de los aminoácidos alifáticos de cadena ramificada inducen inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial

OLHA ZHENYUKH

LICENCIADA EN FARMACIA

DIRECTORES:

JESÚS EGIDO DE LOS RÍOS Y SEBASTIAN MAS FONTAO

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

*“Basta una persona o una idea para cambiar tu vida,
ya sea para bien o para mal”*

Joe Strummer

*“El éxito en la vida consiste en
seguir siempre adelante”*

Samuel Johnson

*“Lo que realmente merece la pena,
nunca será fácil de conseguir”*

Anónimo”

A mis padres

A Roman

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
LISTADO DE ABREVIATURAS	5
I. INTRODUCCIÓN	11
1. LOS AMINOÁCIDOS ALIFÁTICOS DE CADENA RAMIFICADA (BCAA)	11
1.1. Funciones biológicas de los BCAA	11
1.2. Absorción y metabolismo de los BCAA.....	12
1.3. Utilización e importancia de los BCAA en el ámbito del deporte	14
1.4. Los BCAA en la obesidad y diabetes mellitus de tipo 2	15
2. INFLAMACIÓN ASOCIADA A LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS Y CARDIOVASCULARES	16
2.1. Fases y mediadores del proceso inflamatorio	16
2.2. Ruta de señalización del factor de transcripción NF-κB en inflamación	17
2.2.1. Ruta clásica	18
2.2.2. Ruta alternativa	18
2.3. Los BCAA y la inflamación.....	19
3. ESTRÉS OXIDATIVO	20
3.1. Especies reactivas de oxígeno	20
3.2. NADPH oxidasa.....	21
3.3. Mitocondria	22
3.4. Sistemas antioxidantes.....	23
3.4.1. Mecanismos antioxidantes derivados de Nrf2	24
3.5. Los BCAA y el estrés oxidativo	25
4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES ACTIVADAS POR LOS BCAA	26
4.1. Vía de señalización de PI3K/Akt.....	26
4.2. Vía de señalización de AMPK	26
4.3. Vía de señalización mTOR.....	27
5. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	29
5.1. Estructura de la pared arterial	29
5.1.1. Capa íntima	29
5.1.2. Capa media	29
5.1.3. Capa adventicia	30
5.2. Mecanismos implicados en la contracción del músculo liso vascular.....	30
5.3. Factores vasoactivos que regulan el tono vascular.....	31
5.3.1. Óxido Nítrico (NO).....	31
5.3.2. Factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF).....	32
5.4. Disfunción endotelial.....	33
5.4.1. Papel de las ROS y la inflamación en la disfunción endotelial	34
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	40
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. CULTIVOS CELULARES	43
1.1. Cultivo primario de células endoteliales (CE)	43
1.2. Cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	43
1.3. Protocolo experimental	44
2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	45
2.1. Extracción de proteínas totales.....	45
2.2. Western blot	45
2.3. Inmunocitofluorescencia	46

2.4. Técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.....	47
3. ANÁLISIS de ARN	47
3.1. Extracción de ARN	47
3.2. PCR cuantitativa a tiempo real.....	47
4. ENSAYO DE UNIÓN AL ADN	48
4.1. Extracción de proteínas nucleares	48
4.2. Preparación de placa	49
4.3. Unión de proteína al ADN.....	49
5. MEDIDA DE ESTRÉS OXIDATIVO	50
5.1. Detección de ROS por fluorescencia.....	50
5.2. Actividad NADPH oxidasa	50
5.3. Medida de la producción de O ₂ ^{•-} en células en cultivo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	50
5.4. Medida del potencial de membrana mitocondrial	51
6. ENSAYOS FUNCIONALES	51
6.1. Ensayo de migración.....	51
6.2. Adhesión celular.....	52
7. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	52
7.1. Animales empleados	52
7.2. Protocolos experimentales	53
8. ENSAYO CLÍNICO	56
8.1. Criterios de inclusión	56
8.2. Criterios de exclusión	56
8.3. Los resultados obtenidos son de los dos grupos de participantes.....	57
8.4. La determinación de los BCAA en suero	57
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
IV. RESULTADOS	61
PARTE 1: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE BCAA <i>IN VITRO</i> EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) DE SUJETOS SANOS	61
1.1. Los BCAA inducen estrés oxidativo de manera tiempo y dosis dependiente.....	61
1.2. Los BCAA estimulan la vía de señalización PI3K/Akt-mTORC1	63
1.3. Los BCAA activan la vía de señalización de AMPK y su activador modula la activación de Akt y TORC1.....	65
1.4. Los BCAA inducen el estrés oxidativo mediante la vía mTORC1 y AMPK.....	67
1.5. Los BCAA pueden causar disfunción mitocondrial.....	68
1.6. Los BCAA promueven la activación de NF-κB y la expresión de los genes pro-inflamatorios	69
1.7. Los BCAA inducen la migración de células mononucleares circulantes	72
1.8. Los BCAA activan respuestas antioxidantes y antiinflamatorias mediadas por AMPK	73
PARTE 2: NIVELES ELEVADOS DE AMINOÁCIDOS ALIFÁTICOS DE CADENA RAMIFICADA PROMUEVEN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN.....	75
2.1. Los BCAA activan la vía de señalización mTORC1 y AMPK en CE de manera dosis dependiente.....	75
2.2. Los BCAA inducen el estrés oxidativo mediante la activación de las vías de señalización mTORC1 y AMPK	77
2.3. Los BCAA promueven la activación de NF-κB y la expresión de los genes inflamatorios	78
2.4. Los BCAA inducen la adhesión de células mononucleares al endotelio.....	80

2.5. Los BCAA producen respuesta contráctil en la aorta de manera dosis dependiente	80
2.6. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante sobre la capacidad contráctil inducida por los BCAA	81
2.7. La contracción de la aorta inducida por BCAA es endotelio dependiente	82
2.8. Los BCAA causa disfunción endotelial prolongada en la aorta	84
PARTE 3: ENSAYO CLÍNICO EXPLORATORIO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LOS SUPLEMENTOS DE LOS BCAA SOBRE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN INDIVIDUOS SANOS.....	
3.1. Características de los participantes.....	86
3.2. La suplementación diaria con BCAA incrementa los niveles séricos de BCAA	87
3.3. La suplementación con BCAA durante 7 día activa respuestas pro-inflamatorias en sujetos sanos	88
3.4. El consumo diario de BCAA durante 7 día activa estrés oxidativo en sujetos sanos	91
3.5. Activación de la respuesta antioxidante y antiinflamatoria en sujetos sanos	92
V. DISCUSIÓN	95
1. EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE BCAA SÉRICOS Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA	95
2. LA EXPOSICIÓN A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE LOS BCAA INDUCE UN ESTADO PRO-INFLAMATORIO MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE NF- κ B	96
3. LA EXPOSICIÓN A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE LOS BCAA ACTIVA LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO VÍA NOX-1, NOX-2 Y LA MITOCONDRIA.....	97
4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES ACTIVADAS POR LOS BCAA	98
5. LOS BCAA INDUCEN CAMBIOS EN LA RESPUESTA CONTRÁCTIL VASCULAR Y GENERAN DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	99
6. LOS EFECTOS ADVERSOS DE LA SUPLEMENTACIÓN EXCESIVA O PROLONGADA CON LOS BCAA EN EL DEPORTE	100
VI. CONCLUSIONES	107
VII. BIBLIOGRAFÍA	111
VIII. ANEXOS.....	129

RESUMEN

Los aminoácidos alifáticos de cadena ramificados (BCAA: leucina, isoleucina y valina) son aminoácidos esenciales que constituyen la base de las proteínas del músculo esquelético humano, modulan el metabolismo de la glucosa y contribuyen al mantenimiento de la correcta función del cerebro. Por ello, los BCAA se utilizan como suplementos en estados de malnutrición, pacientes críticos y oncológicos para evitar la caquexia muscular. Además, estos aminoácidos son comúnmente utilizados a dosis elevadas como suplementos nutricionales y efectos anabolizantes para mejorar el rendimiento físico y mental de los atletas. Sin embargo, existen pocos estudios para conocer los posibles efectos adversos de la suplementación excesiva o prolongada en el tiempo.

Varios estudios han descrito la existencia de niveles séricos elevados de los BCAA en determinadas situaciones patológicas como la enfermedad de Jarabe de Arce (MSUD), la DMT2 y la obesidad. En el primer caso, los niveles elevados de los BCAA de forma crónica causan daños neurológicos severos. Mientras que en el caso de DMT2 y obesidad el aumento de los BCAA se asocia a la resistencia a la insulina, por mecanismos todavía poco estudiados. Además, se ha sugerido que incrementos discretos de los BCAA séricos podrían ser predictores de la futura aparición de diabetes y correlacionarse con las complicaciones cardiometabólicas y vasculares. Sin embargo, sus efectos directos sobre la pared vascular no han sido aún investigados. Por otro lado, la inflamación crónica de bajo grado y el estrés oxidativo son los principales mecanismos fisiopatológicos que participan en el desarrollo de las enfermedades como la DMT2, la obesidad y la aterosclerosis que conducen a la resistencia a la insulina, la disfunción endotelial y a las complicaciones micro- y macro-vasculares.

Por todo ello, el principal objetivo del presente trabajo fue investigar si los BCAA podrían inducir, de forma directa, un aumento en la producción de las ROS y la inflamación, así como sus consecuencias funcionales. Con el fin de dar respuesta a este objetivo, se realizaron estudios a tres niveles: *in vitro*, empleando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células endoteliales (CE), *ex vivo*, en aortas de ratón incubadas con los BCAA e *in vivo*, en la población sana sometida a una suplementación con los BCAA durante 7 días.

Los resultados obtenidos han mostrado que los BCAA, tanto en células en cultivo como en aorta de ratón *ex vivo*, inducen un aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial y en la actividad NADPH oxidasa con la participación de NOX-1 y NOX-2. Además, el tratamiento de la aorta *ex vivo* con los BCAA aumentó la respuesta contráctil vascular, generó disfunción endotelial dependiente de ROS, indujo desacoplamiento de eNOS e incrementó la expresión de iNOS. Todos estos fenómenos contribuyen, en conjunto, a la disminución de la biodisponibilidad de NO en el lecho vascular.

Por otro lado, los BCAA indujeron respuestas pro-inflamatorias, tales como la activación de la ruta NF- κ B y la producción de mediadores pro-inflamatorios como citoquinas (IL-6 y TNF- α) y moléculas de adhesión (ICAM-1, E-selectina y CD40L). El estado pro-inflamatorio y pro-oxidante desencadenado en presencia de los BCAA confirió una mayor capacidad de adhesión endotelial y migración de diferentes células inflamatorias causando potencialmente disfunción endotelial y daño vascular. Adicionalmente, mediante abordajes farmacológicos se demostró que los BCAA ejercen sus efectos intracelulares principalmente a través de la activación del eje de señalización que implica PI3K/Akt, mTORC1 y AMPK.

Finalmente, al evaluar el efecto de los suplementos de los BCAA en sujetos sanos, se observó un incremento de los niveles séricos de los BCAA a valores similares a los encontrados en pacientes diabéticos y obesos. Las concentraciones alcanzadas de los BCAA indujeron activación del estrés oxidativo y la inflamación por vía NF- κ B.

En conjunto, estos resultados muestran que los niveles séricos elevados de los BCAA pueden actuar modulando respuestas pro-inflamatorias y procesos redox mediante la activación de la vía mTORC1. Estos datos sugieren además que el uso de suplementos con altas dosis de BCAA entre los deportistas podría no ser tan inocuas como se considera. Aún que se requiere ampliar el estudio a número mayor de sujetos y de confirmarse los resultados, creemos que los posibles efectos adversos de su administración crónica deberían incluirse en su ficha técnica.

SUMMARY

Branched-chain amino acids (BCAA: leucine, isoleucine and valine) are essential amino acids which are important components of proteins in the human skeletal muscle. BCAA modulate glucose metabolism and contribute to the maintenance of correct brain function. Therefore, BCAA are used as supplements in states of malnutrition to prevent muscular cachexia in critical and oncological patients. In addition, these amino acids are commonly used as nutritional supplements potentially to improve mental and physical performance and with the purpose of muscle building at high doses, without solid and well performed studies about the toxicity of excessive or chronic BCAA supplementation.

Increased BCAA plasma concentrations have been found in several pathological and physiological conditions, such as Maple syrup disease (MSUD), T2DM and obesity. MSUD patients present highly elevated BCAA concentrations which are responsible of several neurological damages. In T2DM and obesity elevated BCAA concentrations are associated with insulin resistance, but the involved mechanisms in this pathological process are rather poorly understood. In spite of that, BCAA blood levels were suggested as important predictors of future diabetes and they were correlated with cardiometabolic complications, such as atherosclerosis or coronary artery disease. Although, direct effects of BCAA on vascular wall have not yet been investigated. On the other hand, chronic low-grade inflammation and oxidative stress are the major pathophysiological mechanisms involved in the development of diseases such as T2DM, obesity and atherosclerosis leading to insulin resistance, endothelial dysfunction and micro- and macro-vascular complications.

Thus, the main aim of the present study was to investigate whether BCAA could directly induce the production of ROS and inflammation, as well as, their functional consequences. The study was performed at three different levels: *in vitro*, using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and endothelial cells (CE), *ex vivo*, in mice aortas incubated with BCAA, and *in vivo*, in healthy population who received BCAA supplements for 7 days.

The obtained results show that BCAA exhibited increased $O_2^{\bullet-}$ generation by mitochondrial and NADPH oxidase activity involving the NOX-1 and NOX-2 participation, *in vitro*, in PBMC/CE and *ex vivo* in mice aortas. In addition, *ex vivo* treatment of aortas with BCAA induced vasoconstriction and caused ROS-dependent endothelial dysfunction by decoupling of eNOS and increased iNOS expression. All these phenomena together caused a decrease in the NO bioavailability in vascular wall.

On the other hand, BCAA induced pro-inflammatory responses by NF- κ B pathway activation and production of pro-inflammatory mediators, such as cytokines (IL-6 and TNF- α) and adhesion molecules (ICAM-1, E-selectin and CD40L). The BCAA-triggered pro-inflammatory and pro-

oxidant states conferred adhesion and migration capacity to different inflammatory cells potentially causing endothelial dysfunction and vascular damage. Moreover, pharmacological inhibition of intracellular signaling axis involving PI3K/Akt, mTORC1 and AMPK improved BCAA-induced negative effects.

Finally, the impact of BCAA supplements were evaluated on healthy subjects. We observed the elevation of BCAA serum levels at similar concentrations found in diabetic and obese patients. The increased BCAA concentrations induced oxidative stress generation and inflammation via NF- κ B in healthy population after 7 days supplementation.

In conclusion, these findings demonstrate that BCAA could modulate pro-inflammatory responses and redox processes activated by mTORC1 pathway. In addition, we suggest that the use of BCAA supplements among athletes would not be as safe as it has been considered. Thus, although more data are needed, we advise to include possible adverse effects of chronic administration of these compounds in their datasheet.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

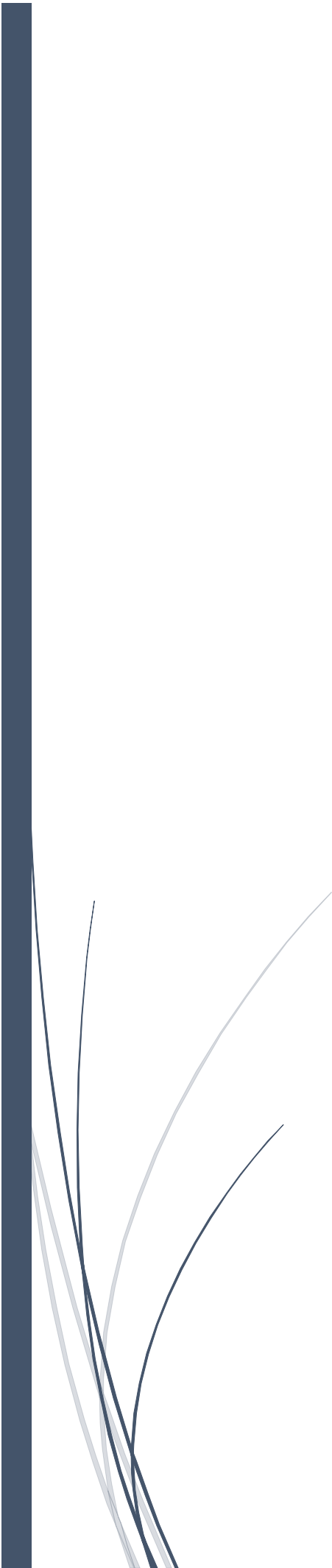
$\Delta\Psi_m$	Potencial de la membrana mitocondrial
Ab	Anticuerpo
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamida 1- β -D-ribofuranodido
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AngII	Angiotensina II
AP	Fosfatasa alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCA	Ácido bicineónico
BCAA	Branched-chain amino acids o aminoácidos alifáticos de cadena ramificada
BCKA	Alfa-cetoácidos
BCAT	Aminotransferasa de cadena ramificada
BCKDC	Complejo multienzimático de la deshidrogenasa de alfa-cetoácido de cadena ramificada
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albúmina de suero bovino
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
CaM	Calmodulina
CE	Célula endotelial
CD40L	CD40 ligando
CIP	Cóctel de inhibidores de proteasas
CMLV	Célula de músculo liso vascular
CRM	Cadena respiratoria mitocondrial
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DHE	Dihidroetidio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPI	Cloruro de difenileneiodonio

DPTA	Ácido dietilentriamina pentaacético
DTT	Ditiotreitol
E⁺	Etidio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FBS	Suero fetal bovino
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa
GSH-Px	Glutation peroxidasa
GTPc	Guanosín trifosfato cíclico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HO-1	Hemooxigenasa 1
HRP	Peroxidasa de rábano picante
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IL-6	Interleuquina-6
IFN-γ	Interferón-γ
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JAK	Quinasa Janus
Keap1	Proteína asociada a Kelch-ECH 1
KHS	Solución de Krebs-Henseleit
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MCT	Transportador de monocarboxilato
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa
Mitotempo	2,6,6-tetrametil-4-[[2-(trifenilfosfonio)acetil]amino]-1-piperidinilo clorido
mPTP	Poro de transición mitocondrial
mTORC	Malian target of rapamycin complex o la diana de rapamicina en mamíferos
MSUD	Maple Syrup Urine Disease o la enfermedad de orina de Jarabe de Arce
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ABREVIATURAS

NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
Nrf2	Proteína asociada al factor nuclear eritroide-2
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NQO1	NADPH quinona oxidoreductasa
ONOO-	Peroxinitrito
O₂^{•-}	Anión superóxido
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
Phe	Fenilefrina
p-NPP	p-nitrofenil fosfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
TBS	Tampón tris salino
TLR	Receptor tipo toll
TMRM	Tetrametil rodamina metil éster
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TRX	Tiorredoxina
UCP-2	Proteína desacoplante 2 mitocondrial
uNOS	NOS desacoplada

I. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

La metabolómica permite la identificación y la cuantificación exhaustiva y simultánea de una gran parte de los metabolitos presentes en muestras biológicas como los fluidos, los tejidos y las células [1], proporcionando una visión general del cuadro metabólico y del proceso bioquímico global [2,3]. En las últimas décadas, gracias a los nuevos avances en metabolómica se ha conseguido obtener gran cantidad de información de forma sistemática sobre los mecanismos subyacentes de importantes enfermedades metabólicas, entre ellas la diabetes tipo 2 (DMT2), la obesidad y el cáncer. Los metabolitos pueden ser los sustratos o los productos de las redes bioquímicas complejas asociadas con las vías biológicas celulares o sistémicas y están presentes en suero sanguíneo, orina, bilis, líquido seminal, líquido sinovial, líquido amniótico, aspirado intestinal, líquido cefalorraquídeo, saliva y tejidos [4–7]. Los hidratos de carbono, los ácidos grasos y los aminoácidos son los metabolitos más comunes involucrados en diversos procesos fisiológicos para la señalización, la supervivencia y las funciones estructurales [8].

1. LOS AMINOÁCIDOS ALIFÁTICOS DE CADENA RAMIFICADA (BCAA)

1.1. Funciones biológicas de los BCAA

Los aminoácidos son compuestos orgánicos biológicos que constituyen la base de las proteínas. Existen dos grupos de aminoácidos que son los denominados esenciales y no esenciales, siendo los primeros aquellos no sintetizados por el organismo y que deben ser aportados mediante la dieta. Entre los aminoácidos esenciales, un grupo compuesto por leucina, isoleucina y valina son aminoácidos alifáticos de cadena ramificada (BCAA, del inglés *branched-chain amino acids*).

En un estado fisiológico normal, los BCAA desempeñan un papel importante en la homeostasis de numerosas funciones fisiológicas como la regulación de la ingesta de alimentos en relación con la liberación de leptina de los tejidos adiposos [9], la biosíntesis de proteínas en el músculo (componen casi la tercera parte de los músculos esqueléticos del cuerpo humano) [10], la modulación del metabolismo de la glucosa y la oxidación [11] y en el mantenimiento de la correcta función del cerebro [12,13]. Por ello, los BCAA también se emplean en suplementos nutricionales para los pacientes críticos como quemados, con insuficiencia renal crónica en diálisis [14], pacientes sometidos a procesos quirúrgicos y en algunos casos como coadyuvante del tratamiento en cáncer de hígado [15,16], con el fin combatir la malnutrición y evitar la caquexia muscular en estos enfermos.

1.2. Absorción y metabolismo de los BCAA

Los BCAA son absorbidos en el intestino por las células epiteliales mediante un sistema de transportadores tipo A y L específicos de aminoácidos [17,18]. En cambio, el transporte hacia las mitocondrias se lleva a cabo por otro mecanismo de transporte [19], manteniéndose así los diferentes niveles de BCAA en el citosol donde éstos actuarían como moléculas de señalización, y en las mitocondrias, donde finalmente se degradan para producir energía. Estos mecanismos de transporte también se regulan diferencialmente entre los tejidos.

A diferencia de la mayoría de los aminoácidos, sólo una fracción minoritaria de los BCAA procedente de la dieta son metabolizados por el hígado; mientras que la mayor parte de ellos entran a la circulación sistémica para llegar a sus principales sitios de metabolismo, incluyendo los músculos esqueléticos, tejido adiposo y cerebro [13,20].

La degradación metabólica de los BCAA transcurre en dos etapas principales que se expresan diferencialmente en el músculo y el hígado [21,22]. Su catabolismo tiene lugar dentro de las mitocondrias y las dos etapas principales son: la transaminación reversible con alfa-cetoglutarato para formar alfa-cetoácidos (BCKA), seguido de la descarboxilación irreversible para formar tioésteres con la Coenzima A (CoA) que entran en el ciclo de Krebs.

En el **músculo**, los BCAA sufren la etapa de transaminación que está catalizada por la aminotransferasa de cadena ramificada (BCAT) dando lugar a los BCKA correspondientes. A diferencia de los aminoácidos de cadena ramificada, el transporte de alfa-cetoácido no está gobernado por un solo transportador, sino que está mediado por los transportadores de monocarboxilato (MCT), que también controlan el movimiento de cuerpos de lactato, piruvato y cetona a través de la membrana plasmática [23]. Existen diferentes MCT que son activos en diferentes tejidos y cuya actividad transportadora es indicativa de la regulación metabólica específica de órganos. Así por ejemplo, se conoce que el músculo co-expresa múltiples MCT, (MCT 1, 2, 4, 5, 6 y 7), lo que indica una necesidad de alto rendimiento energético en las células musculares. Utilizando estos mecanismos de transporte, los recién metabolizados BCKA pueden viajar desde el músculo a otros tejidos periféricos, especialmente el hígado, para completar su degradación. En el **hígado**, los BCKA se someten a descarboxilación oxidativa, que es catalizada por el complejo multienzimático de la deshidrogenasa de alfa-cetoácido de cadena ramificada (BCKDH), siendo los productos finales ésteres acil-coenzima A de cadena ramificada.

Es importante destacar la relación de la actividad enzimática entre BCAT y BCKDH. La expresión BCAT es alta en músculo, lo que tiende a favorecer la liberación de BCKA en la circulación a través del transporte MCT en lugar de su oxidación. Mientras que en el hígado, la proporción se invierte, la BCAT está prácticamente ausente y la actividad de BCKDH es elevada, por lo que se promueve la oxidación de BCKA [22] (**Figura 1**).

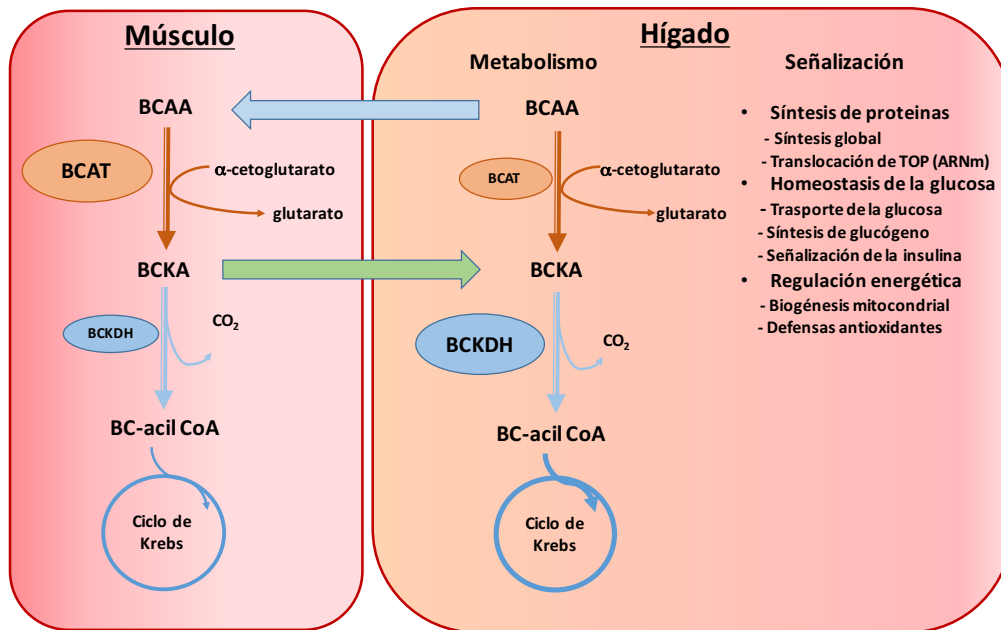


Figura 1. Metabolismo de los BCAA en el hígado y el músculo. Modificado de Mattick et al. [21].

El paso de degradación regulado por BCKDH es crítico y una mutación en los genes que codifican los componentes del complejo enzimático (situadas en los cromosomas 19, 6, 1 y 7, en las regiones 19qB1, 6p21-22, 1p31 y 7 q31-q32), da lugar a una enfermedad hereditaria rara llamada la enfermedad de orina de Jarabe de Arce o en inglés llamada **Maple Syrup Urine Disease (MSUD)**. Esta alteración de las vías bioquímicas de degradación de los aminoácidos ramificados provoca la acumulación, principalmente de la leucina y su cetoácido (α -cetoisocaproico) en el organismo. Las altas concentraciones de estos compuestos, interfieren en el funcionamiento de las células cerebrales, sobre todo neuronas y astrocitos, ocasionando daños neurológicos importantes [24,25]. Debido a la heterogeneidad de las mutaciones, la expresión de la enfermedad es variable y existen varias formas de presentación. Sin embargo, los mecanismos involucrados en este proceso patológico son poco conocidos. Algunos estudios sugieren que los BCAA son neurotóxicos *per se* y aumentar la excitotoxicidad en las células neuronales corticales a través de mecanismos que requieren la presencia de astrocitos [26]. Los estudios más recientes sugieren que los BCAA modulan las propiedades inmunes de las células de la microglia [27] y aumentan el perfil inflamatorio de los pacientes con MSUD [25]. Además, la administración crónica de BCAA en ratas con MSUD promueve la oxidación de los lípidos y las proteínas, así como deterioro de las defensas antioxidantes cerebrales aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno, particularmente en la corteza cerebral [28].

1.3. Utilización e importancia de los BCAA en el ámbito del deporte

Además de las condiciones patológicas descritas anteriormente relacionadas con el aumento de los niveles de los BCAA, estos aminoácidos se utilizan comúnmente como suplementos nutricionales por los atletas para mejorar el rendimiento físico y mental o con los propósitos anabolizantes por los culturistas [29]. Sin embargo, los efectos beneficiosos de los BCAA no están avalados por estudios científicos sólidos.

El uso como suplemento en deportes anaeróbicos suele hacerse en tomas con protocolos de dos dosis diarias, generalmente media hora antes y después del ejercicio o media hora antes, durante el ejercicio y después del ejercicio [29–31]. Los aminoácidos de cadena ramificada se comercializan en distintas formas farmacéuticas como comprimidos, cápsulas o polvo para disolver. Además, existe una gran variedad de dosificaciones que van desde 1 hasta 40 gramos por día. Los compuestos comercializados suelen tener un relación de 2:1:1 o 4:1:1 (leucina: isoleucina: valina). Es importante destacar que el consumo de los aminoácidos ramificados se suele acompañar con una dieta rica en proteínas utilizando los llamados “alimentos fuentes de BCAA”, así como múltiples vitaminas (fundamentalmente la vitamina B6 o C) y los minerales (fundamentalmente el magnesio). Los alimentos que más contenido en BCAA tienen son los huevos, las carnes de aves y de ternera, los pescados como atún y salmón y los frutos secos (Tabla 1).

Alimentos	Cantidad de proteína/100 g de alimento	BCAA de la proteína total en g (Leu:Ile:Val)
Ternera magra	21,00 g	3,795 g (1,641:1,015:1,139)
Pechuga de pollo	23,00 g	3,784 g (1,588:1,147:1,049)
Pechuga de pavo	24,12 g	4,300 g (1,850:1,220:1,230)
Huevo entero	12,50 g	2,808 g (1,069:0,789:0,950)
Clara de huevo	11,12 g	2,417 g (0,932:0,639:0,846)
Atún en conserva natural	25,00 g	4,201 g (1,909:1,082:1,210)
Salmón	20,62 g	3,904 g (1,581:1,036:1,241)
Frutos secos	13,54 g	3,123 g (1,480:0,980:0,680)

Tabla 1. Principales alimentos ricos en BCAA.

Sorprendentemente, hasta ahora sólo se han llevado a cabo algunos estudios de suplementación a corto plazo [30,31], pero se desconocen las implicaciones clínicas potenciales de la suplementación crónica de los BCAA. La información de seguridad de estos productos no indican posibles efectos adversos asociados a su consumo, siempre que este no supere la dosis

recomendada. Apareciendo como únicas limitaciones de su consumo, salvo en el caso de embarazadas o menores de 12 años.

1.4. Los BCAA en la obesidad y diabetes mellitus de tipo 2

Las enfermedades metabólicas son síndromes comunes que afectan la salud de la población general en todo el mundo. Estos trastornos son la consecuencia del desequilibrio entre la compleja interacción de la predisposición genética y los factores ambientales como el estilo de vida sedentario, los hábitos alimenticio no saludables, el desequilibrio hormonal y el estrés metabólico [32,33]. Las caracterizaciones clínicas de los mismos están marcadas por la hiperglucemia, la dislipidemia, la alteración de la tolerancia a la glucosa (ITG), la resistencia a la insulina [33,34], la hipertensión y otras complicaciones relacionadas con las enfermedades cardiovasculares [34,35].

Uno de los trastornos metabólicos con mayor prevalencia global y un crecimiento epidemiológico, hoy en día, es la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) [36]. En este sentido, está ampliamente descrita la fuertemente asociación que existe entre padecimiento de la DMT2 y la obesidad, el envejecimiento y los estilos de vida sedentarios [36–38]. La obesidad es una adaptación de nuestro cuerpo a la ingesta de calorías no aprovechables y la falta de actividad física.

Por primera vez en los años 70, varios estudios describieron un aumento de los niveles séricos de los BCAA en sujetos obesos, en comparación con los sujetos sanos [39–42] y su asociación con futura diabetes. Posteriormente, diferentes estudios de metabolómica describieron una asociación negativa entre las concentraciones plasmáticas de los BCAA y la sensibilidad a la insulina en pacientes con sobrepeso y obesidad [43–45], lo que sugiere que los BCAA podría estar involucrados en trastornos relacionados con la insulina. Además, las elevadas concentraciones de los BCAA se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal en adultos y niños, mientras que la reducción de peso mejora el perfil sérico de los BCAA [46–48]. Por ello, los BCAA fueron sugeridos como un importante predictor de futura aparición de diabetes [46], y sus niveles sanguíneos se correlacionan con las complicaciones cardiometabólicas, incluida la resistencia a la insulina [39,44].

Con el propósito de descifrar los mecanismos por los cuales los BCAA podrían llegar a causar los efectos deletéreos arriba descritos, Newgard y colaboradores [44] realizaron modelos experimentales en tres grupos de ratas alimentadas con diferentes dietas que fueron: estándar, alta en grasa y alta en grasa-BCAA, respectivamente. A partir de este estudio, los autores propusieron que los cambios en los perfiles de aminoácidos no son la causa directa de la obesidad y la resistencia a la insulina, sino más bien el resultado de efectos sinérgicos entre los

I. INTRODUCCIÓN

mismos y los ésteres con CoA (succinyl coA y propionyl coA o los también llamados C3 y C5 acil-carnitinas). En primer lugar, la acumulación de estos metabolitos activos procedentes del consumo aumentado de grasas, actúan produciendo estrés en la función mitocondrial [44,49]. Y en segundo lugar, los BCAA y particularmente la leucina, son fuertes activadores de señales de nutricionales que actúan principalmente a través de la activación del complejo 1 de mTOR (mTORC1). De hecho, la fosforilación crónica de mTOR conduce a la activación de quinasas como c-Jun (JNK) y el sustrato 1 de receptor de insulina (IRS1) que contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina en ratas alimentadas con dieta alta en grasa-BCAA [44].

Aparte de ser considerados como predictores de la obesidad y la diabetes, los BCAA circulante también fueron asociados positivamente con mayor riesgo cardiovascular [50,51] y recientemente fueron considerados biomarcadores de las complicaciones vasculares, como la aterosclerosis subclínica o la enfermedad arterial coronaria [52].

Es importante destacar que la inflamación crónica de bajo grado [53–55] y el estrés oxidativo [56–58] son los principales mecanismos fisiopatológicos presentes en la DMT2, la obesidad y aterosclerosis que conducen a la resistencia a la insulina, las disfunciones endoteliales y las complicaciones micro- y macro-vasculares.

2. INFLAMACIÓN ASOCIADA A LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS Y CARDIOVASCULARES

2.1. Fases y mediadores del proceso inflamatorio

La respuesta inflamatoria es un proceso muy conservado que conlleva la sucesión de diferentes etapas que son la iniciación, la consolidación y la resolución, independientemente de factores que la activen [59]. Cada vez más estudios destacan el papel clave que desempeña la inflamación en la patogenia en la DMT2, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis e hipertensión [53–55].

Bajo circunstancias patológicas, el espacio subendotelial del vaso puede convertirse en un entorno inflamatorio activo en el que se secretan **citoquinas** pro-inflamatorias, como IL-1 β , IL-6 o TNF- α , que conducen a la fase de iniciación de la inflamación. Estas citoquinas activan a las células endoteliales (CE) del vaso, las cuales a su vez expresan **moléculas de adhesión** y conducen a un reclutamiento leucocitario. El reclutamiento comienza con el rodado leucocitario sobre la pared vascular, el cual viene regulado por la familia de proteínas selectinas y sus ligandos como E-selectina y CD40L [60,61], hasta que los leucocitos encuentran un estímulo que dispara la activación dependiente de adhesión y terminan fijándose a la pared vascular [62]. Entre otras, las moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y vascular-1 (VCAM-1) son proteínas involucradas también en la unión entre células o con la matriz extracelular y favorecen la adhesión e infiltración de los monocitos y linfocitos T circulantes al endotelio inflamado, así

como la migración y la proliferación de CMLV [63–65].

Debido a la gran importancia que tienen estos factores en el desarrollo de la inflamación vascular, existen diversos estudios que han correlacionado el aumento los niveles plasmáticos de las formas solubles de E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, TNF- α e IL-6 como marcadores de disfunción endotelial en pacientes con el fallo cardíaco crónico, con o sin diabetes [66–69], con diabetes de tipo 1 normotensa [70] y con hipertensión esencial asociada a la tolerancia disminuida a la glucosa [71].

Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos sufren el proceso trans migración hacia la capa íntima del vaso, en la cual las quimioquinas juegan un papel muy importante. Las **quimioquinas** son citoquinas que presentan propiedades quimiotácticas para determinados tipos de leucocitos [72,73]. En este punto se produce la fase de consolidación de la inflamación, ya que las células infiltradas continúan secretando citoquinas y quimioquinas, contribuyendo a mantener y/o aumentar el ambiente pro-inflamatorio. Dentro de las quimioquinas, existen diferentes tipos atendiendo a su estructura y función, siendo la familia más grande la formada por las quimioquinas de tipo CC. Las más importantes en el desarrollo de la inflamación vascular son (RANTES/CCL5) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1/CCL2) [73], ambas expresadas y secretadas por células T. A nivel vascular se ha descrito el MCP-1 como un factor muy importante en el reclutamiento de monocitos desde la sangre al interior de lesiones ateroscleróticas tempranas, en el desarrollo de hiperplasia intimal postangioplastia, en la vasculogénesis y en la trombosis [73].

La última fase del proceso inflamatorio es la resolución caracterizada por la eliminación de la causa de la inflamación y la reparación del tejido dañado. Existen dos procesos distintos de reparación, por un lado la regeneración, que implica el recambio de células dañadas por células del mismo tipo sin producir una pérdida de función en el tejido; o por otro, el reemplazo por tejido conectivo, el cual origina una cicatriz permanente y conduce a una pérdida de función [74,75].

2.2. Ruta de señalización del factor de transcripción NF- κ B en inflamación

Uno de los mecanismos moleculares más importantes en la regulación del proceso inflamatorio, es el mediado por la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) [76] (**Figura 2**). La familia del factor de transcripción NF- κ B, en mamíferos, consiste en cinco proteínas, RelA (conocido también como p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) y p100/52 (NF- κ B2), que se asocian entre sí dando lugar a diferentes complejos activos formados por homo y heterodímeros [77,78]. En condiciones basales la mayoría de las células presentan en su citoplasma los dímeros de NF- κ B en una conformación

inactiva. Este hecho se debe a la unión de la región DHR de los dímeros con los dominios de repetición de anquirina de alguna de las proteínas tipo I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B δ y Bcl-3) o de las proteínas precursoras p100 y p105 [77].

2.2.1. Ruta clásica

La ruta más conocida para la activación de NF- κ B, es la que se denomina como ruta “canónica” o “clásica”. La activación de la misma es inducida por diversos mediadores de la respuesta inmune innata y adaptativa, entre los que se encuentran diferentes citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-1 β [79,80], receptores TLR [81] o receptores de antígenos (TCR y BCR) [82] y el estrés oxidativo [77,83].

El primer paso de la activación de la ruta canónica es la fosforilación y posterior degradación de I κ B α . En esta fosforilación participa el complejo IKK (quinasa de I κ B) que consta de dos proteínas (IKK1 o IKK α e IKK2 o IKK β) que componen la subunidad catalítica y por la subunidad estructural NEMO (modulador esencial de NF- κ B o IKK γ), necesario para unir el complejo IKK con las señales que preceden a su activación [84,85]. Una vez que I κ B α es fosforilada por el complejo IKK, es ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteosoma 26s. Finalmente, el dímero p50/p65 queda libre y activado, y se transloca al núcleo donde regula la expresión de diversos genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria, como MCP-1, RANTES, TNF- α , ICAM-1 o IL-6 [77,86] (**Figura 2**).

2.2.2. Ruta alternativa

La denominada ruta “no canónica” o “alternativa” es independiente de NEMO y se induce por miembros específicos de la familia de la citoquina TNF, como son BAFF, LT β , TWEAK o el ligando CD40 [77,86,87]. En la activación de esta ruta participa la quinasa inductora de NF- κ B (NIK), la cual fosforila el homodímero IKK α y desencadena su interacción con la proteína p100 que se encuentra unida a RelB. Esta interacción conlleva la fosforilación de p100, la cual es procesada en el proteosoma para dar lugar a p52. Finalmente, el complejo p52/RelB activo se libera translocándose al núcleo para regular la síntesis de diferentes factores, como las quimioquinas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13 [86] (**Figura 2**).

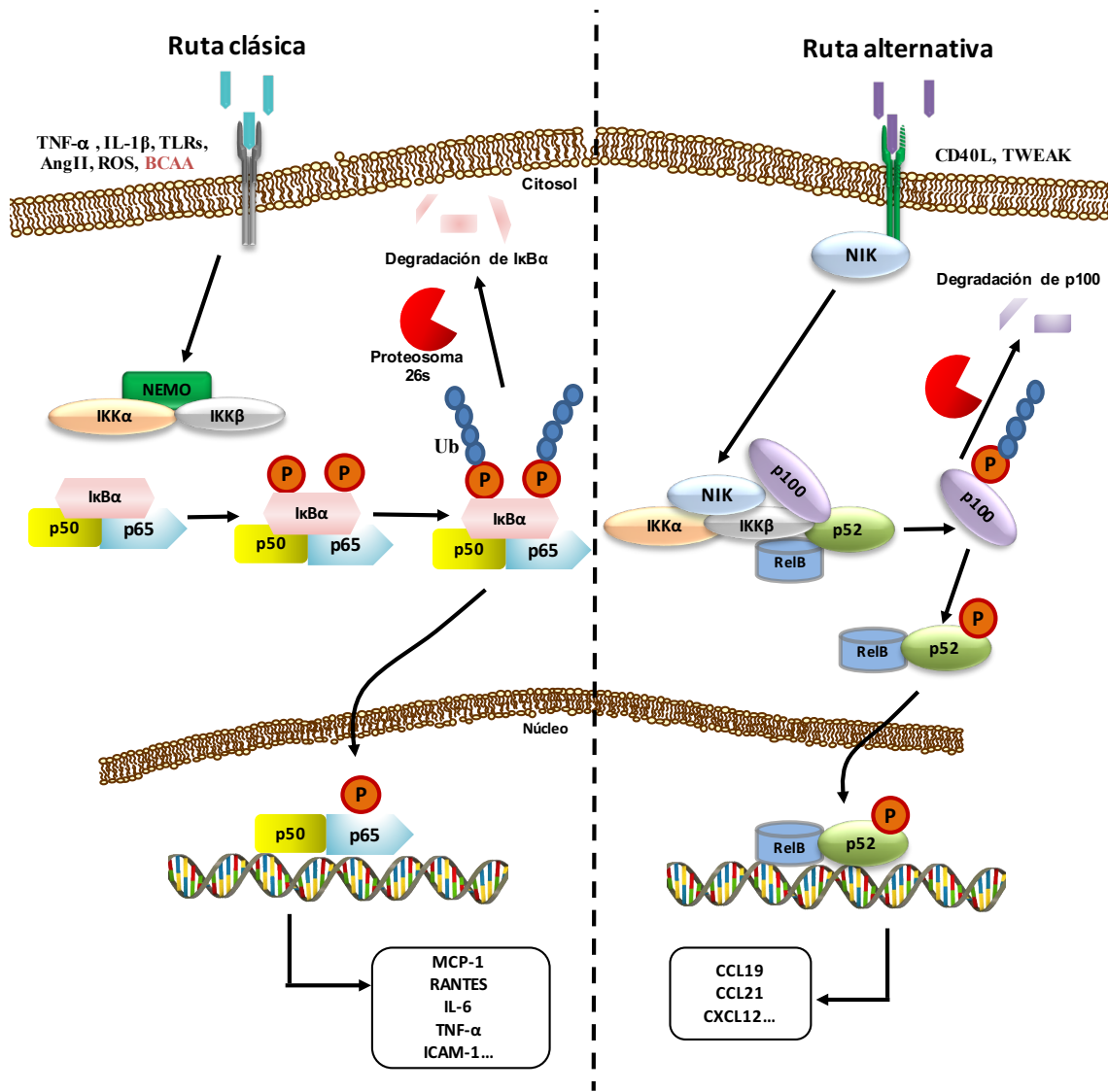


Figura 2. Esquema de la activación de NF-κB por la vía clásica y alternativa.

2.3. Los BCAA y la inflamación

Actualmente existen datos contradictorios sobre el impacto de los niveles dietéticos y circulantes de los BCAA sobre la inflamación. En pacientes con MSUD, las altas concentraciones de los BCAA podrían estar mediando el aumento del perfil de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6 e INF-γ, derivadas de la activación del sistema inmune de la microglia y por la presencia de una inflamación sostenida en estos pacientes [25].

Un estudio reciente en pacientes con resistencia a la insulina demostró correlación positiva de entre los niveles séricos elevados de los BCAA y la expresión de quimioquinas pro inflamatorias como CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5, que activarían la trasmigración leucocitaria al tejido adiposo. Además, la secreción de estas quimioquinas se acompaña por la regulación negativa tanto de los genes relacionados con el catabolismo BCAA y el metabolismo energético mitocondrial [88]. Estos hallazgos sugieren que la inflamación del tejido adiposo y la disfunción mitocondrial

podrían ser eventos tempranos en el desarrollo de la resistencia a la insulina sistémica.

A pesar de existir algunos estudios que relaciona el aumento de los BCAA y el proceso inflamatorio subyacente, se desconocen los mecanismos intracelulares implicados, aunque por el tipo de citoquinas y quimioquinas presentes en suero de las poblaciones estudiadas se puede deducir la posible participación de factor de transcripción NF- κ B.

3. ESTRÉS OXIDATIVO

3.1. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son una clase de moléculas que derivan del metabolismo del oxígeno e incluyen radicales libres y formas no radicales que son generalmente capaces de oxidar dianas celulares. Las ROS actúan como segundos mensajeros intracelulares interaccionando con múltiples vías de señalización, afectando así a funciones celulares como la modulación de la producción y degradación de matriz extracelular, la inactivación de NO, la proliferación, la migración y la muerte celular, la estimulación de algunas quinasas y la expresión de genes pro-inflamatorios [89]. Las especies reactivas de oxígeno incluyen el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peroxinitrito ($OONO^{\bullet}$).

El $O_2^{\bullet-}$ es altamente reactivo, tiene una vida media corta y es incapaz de difundirse a través de las membranas biológicas excepto posiblemente a través de canales iónicos [90]. El $O_2^{\bullet-}$ puede dismutar a H_2O_2 , tanto espontánea como enzimáticamente a través de cualquiera de las tres isoformas de la superóxido dismutasa (SOD): citosólica Cu/Zn-SOD o SOD1, mitocondrial Mn-SOD o SOD2 y extracelular EC-SOD o SOD3. El H_2O_2 es más estable que el $O_2^{\bullet-}$ y atraviesa membranas a través de algunos miembros de la familia de la acuaporina [91]. El H_2O_2 se metaboliza rápidamente en agua y oxígeno por varios sistemas enzimáticos como la glutatión peroxidasa, la catalasa y el sistema de tiorredoxina [92]. En presencia de metales de transición (como Fe^{2+}), el H_2O_2 puede convertirse en radicales hidroxilo (HO^{\bullet}), que son altamente reactivos y pueden dañar los lípidos, las proteínas y el ADN [93]. Además, el NO, que tiene una semivida muy corta, puede reaccionar con $O_2^{\bullet-}$ para formar $ONOO^{\bullet}$ que es capaz de modificar la estructura y función de las proteínas (**Figura 3**).

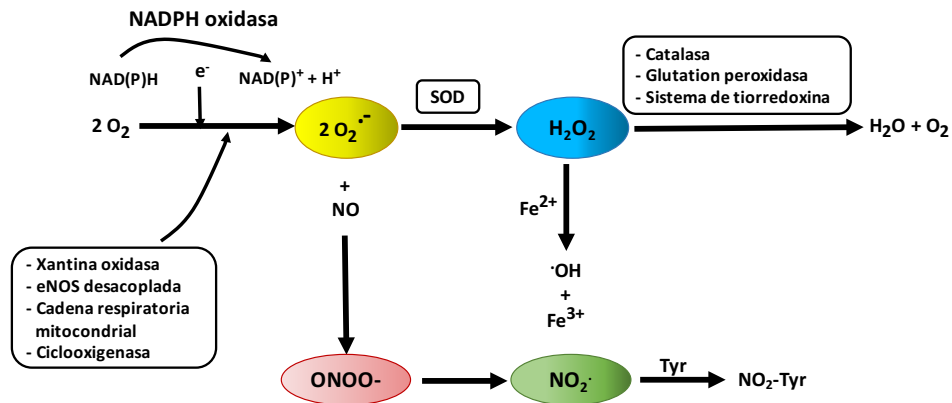


Figura 3. Esquema de la producción de las especies reactivas de oxígeno.

Por lo tanto, la regulación de las ROS es importante para mantener el entorno redox de la célula. A concentraciones intracelulares bajas, las ROS desempeñan un papel clave en la regulación fisiológica del tono vascular, el crecimiento celular, la adhesión, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis [94–96]. Un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los sistemas antioxidantes de la célula es la causa del estrés oxidativo de las células. En la vasculatura, las ROS participan en la peroxidación de lípidos de la pared vascular y disminuyen la disponibilidad de monóxido de nitrógeno endotelial, induciendo en consecuencia la liberación de numerosos mediadores inflamatorios tales como citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y MMP [94,97–99]. La generación de ROS induce procesos celulares asociados a la remodelación vascular y la formación de la placa aterosclerótica tales como la migración, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de las CMLV [91,93,96,100–102].

3.2. NADPH oxidasa

La principal fuente de $O_2^{\bullet -}$ en los vasos sanguíneos y leucocitos es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa [89,95]. La NADPH oxidasa cataliza la reacción de oxidación $NADPH + 2 O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -} + NADP^+ + H^+$, en la que se genera anión superóxido. La NADPH oxidasa tiene varias subunidades catalíticas, entre las cuales, se encuentran la familia NOXs que comprende siete miembros (NOX-1-5, DUOX-1 y -2) [103]. Según el tipo celular, el complejo enzimático se compone de distintas subunidades, siendo, la subunidad transmembrana p22phox esencial para el funcionamiento de la enzima. El complejo también requiere la interacción con la proteína de unión a GTP Rac1/2.

La NOX-1 se expresa en células musculares lisas vasculares (CMLV), fibroblastos y células endoteliales [104]. NOX-4 está ampliamente expresada en todas las células de la pared vascular,

especialmente en la vasculatura cerebral [103]. La expresión de NOX-2 es predominante en CMLV de arterias de resistencia, en células endoteliales, adventiciales [89], linfocitos [90,105] y monocitos/macrófagos [106].

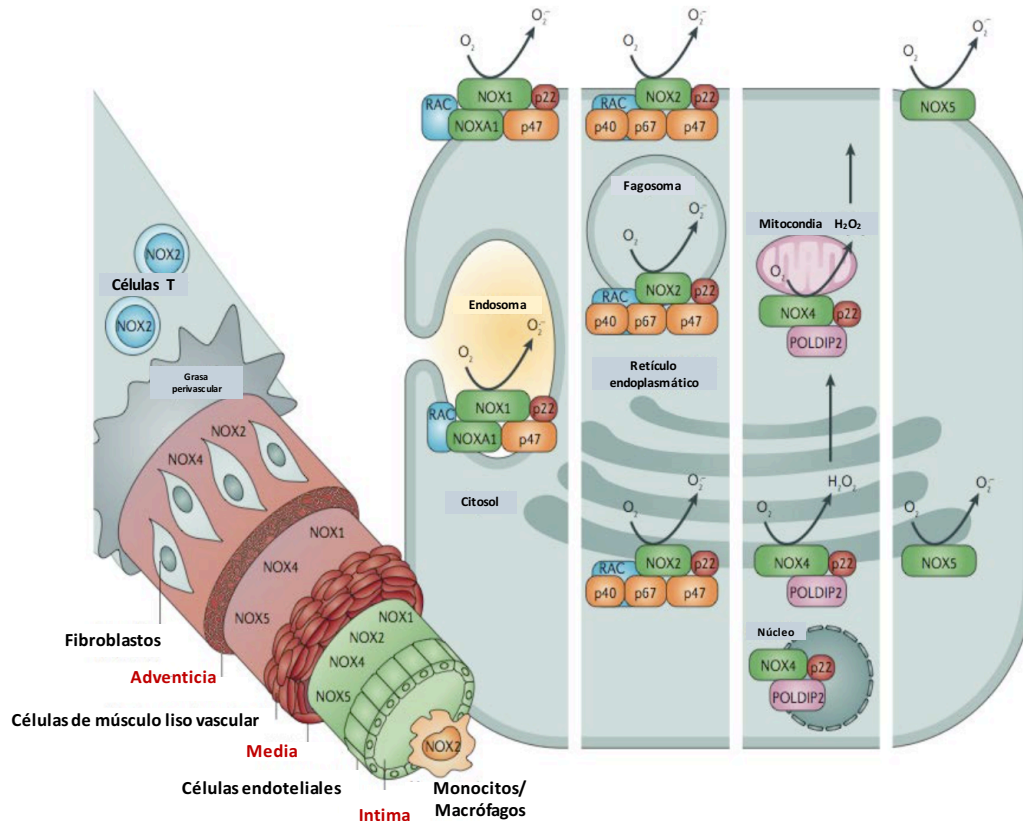


Figura 4. Expresión celular y subcelular de las isoformas de NADPH oxidasa en la pared vascular. Diagrama esquemático que muestra la localización subcelular de las diferentes isoformas de NADPH oxidasa (a la derecha) y su ubicación en diferentes tipos celulares de la pared vascular (a la izquierda). Tomado de Drummond et al., 2011.

3.3. Mitocondria

La cadena respiratoria mitocondrial (CRM) juega un papel importante en el desarrollo del daño oxidativo ya que en la mitocondria se genera la mayor cantidad de ROS de las células [107]. Durante el funcionamiento de la CRM se lleva a cabo la reducción tetravalente de O_2 , los electrones son donados por NADH o succinato a los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa), respectivamente. La ubiquinona o coenzima Q_{10} , que acepta los electrones de estos dos complejos, sufre dos semireacciones de reducción a ubisemiquinona y ubiquinol recibiendo un electrón a la vez (el ciclo Q). Estos electrones posteriormente son donados al complejo III (UQ-citocromo c reductasa), al citocromo c y complejo IV (citocromo c oxidasa) que finalmente los utiliza para reducir al O_2 hasta H_2O [108] (**Figura 5**).

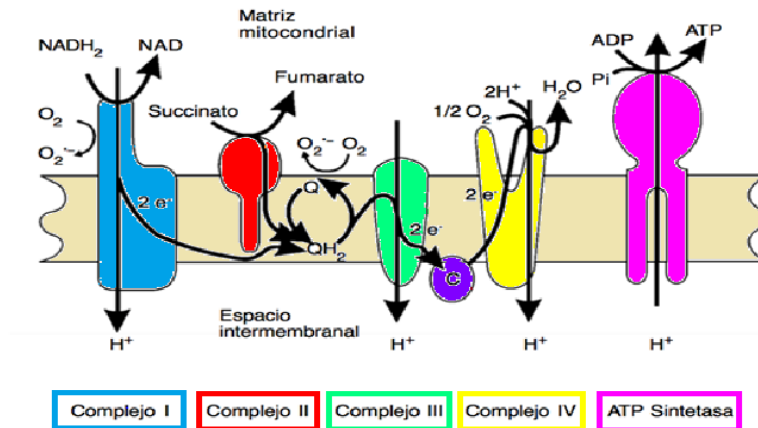


Figura 5. Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial. Se muestra el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, la translocación de protones por los complejos I, III y IV y la síntesis de ATP por la ATP sintasa a partir de ADP y fosfato, además de los sitios que se han identificado como formadores de radical superóxido: el complejo I y la interface entre el ciclo Q y el complejo III. Modificado de Martínez-Abundis et al. [108].

Sin embargo, cualquier desajuste en la CRM puede dar lugar a una mayor acumulación de ROS mitocondriales que inducen la desestabilización de la membrana y del potencial osmótico, causando la sobrecarga de Ca^{2+} y la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP), lo que resulta en un círculo vicioso que conduce al agotamiento de la energía y, finalmente, a la muerte celular [109] en distintas patologías [110].

3.4. Sistemas antioxidantes

En respuesta al estrés oxidativo excesivo, las células activan los mecanismos de defensa antioxidantes, que se pueden dividir en dos grupos enzimáticos y no enzimáticos.

Entre las **enzimas antioxidantes** se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GSH-Px), la catalasa (las tres detalladamente explicadas arriba), la hemoxygenasa (HO-1), la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1) y la tioredoxina (TRX) [111].

Por otro lado, están los **mecanismos antioxidantes no enzimáticos** formados por una serie de sustancias que se oxidan antes que los potenciales compuestos oxidables celulares (ADN, lípidos o proteínas) aun encontrándose en menor concentración que estos. Dentro de este sistema aparecen numerosos compuestos de bajo peso molecular, entre los que destacan el glutatión reducido, la vitamina A, la vitamina C, la vitamina E, los flavonoides, el ácido úrico, los ácidos fenólicos, la bilirrubina, algunos azúcares y aminoácidos, la ubiquinona o la melatonina [112–114].

3.4.1. Mecanismos antioxidantes derivados de Nrf2

La proteína asociada al factor nuclear eritroide (NFE2L2) o Nrf, es un factor de transcripción que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés: "Antioxidant Response Element"), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa. Actualmente se conocen tres proteínas distintas de Nrfs: Nrf1, Nrf2 y Nrf3, siendo Nrf2 la más importante en su función antioxidante. La actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con una proteína citoplásmica llamada proteína asociada a Kelch-ECH 1 (Keap1) y al citoesqueleto. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma 26s, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis *de novo*. Una vez que Nrf2 se fosforila, se transloca al núcleo donde se dimeriza con las proteínas Maf y se une al sitio promotor específico de ARE, para codificar la familia de genes diana de Nrf2 (**Figura 6**).

Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación entre otras [115]. El mecanismo anti-inflamatorio de Nrf2 se explica por la regulación cruzada existente entre la activación de Nrf2 por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β y la represión de la actividad de NF- κ B por Nrf2. Entre los genes diana de Nrf2 que son capaces de influir en la actividad de NF- κ B se encuentran HO-1, la NQO1 y la TRX.

El hierro libre o la bilirrubina procedente de la degradación del grupo hemo por HO-1 se une al sitio de unión de TNF- α , evitando la fosforilación de la subunidad p65 [111,116]. La inducción de HO-1 puede inhibir la degradación de I κ B, mientras que la inhibición de HO-1 aumenta la actividad de p65 en células tumorales humanas (HT-29) y en células de colon tras tratamiento con TNF- α o IL-1 β *in vitro* [117]. Por su parte, la sobreexpresión de NQO1 en células THP-1 reduce la expresión de los genes inflamatorios dependientes de NF- κ B inducida por LPS [118]. Por último, la TRX puede modular la actividad de NF- κ B mediante la reducción de residuos de cisteína. La TRX nuclear es necesaria para la reducción de los residuos de cisteína en p50 para permitir la unión al ADN, mientras que la TRX citoplásmico es capaz de bloquear la degradación de I κ B [111].

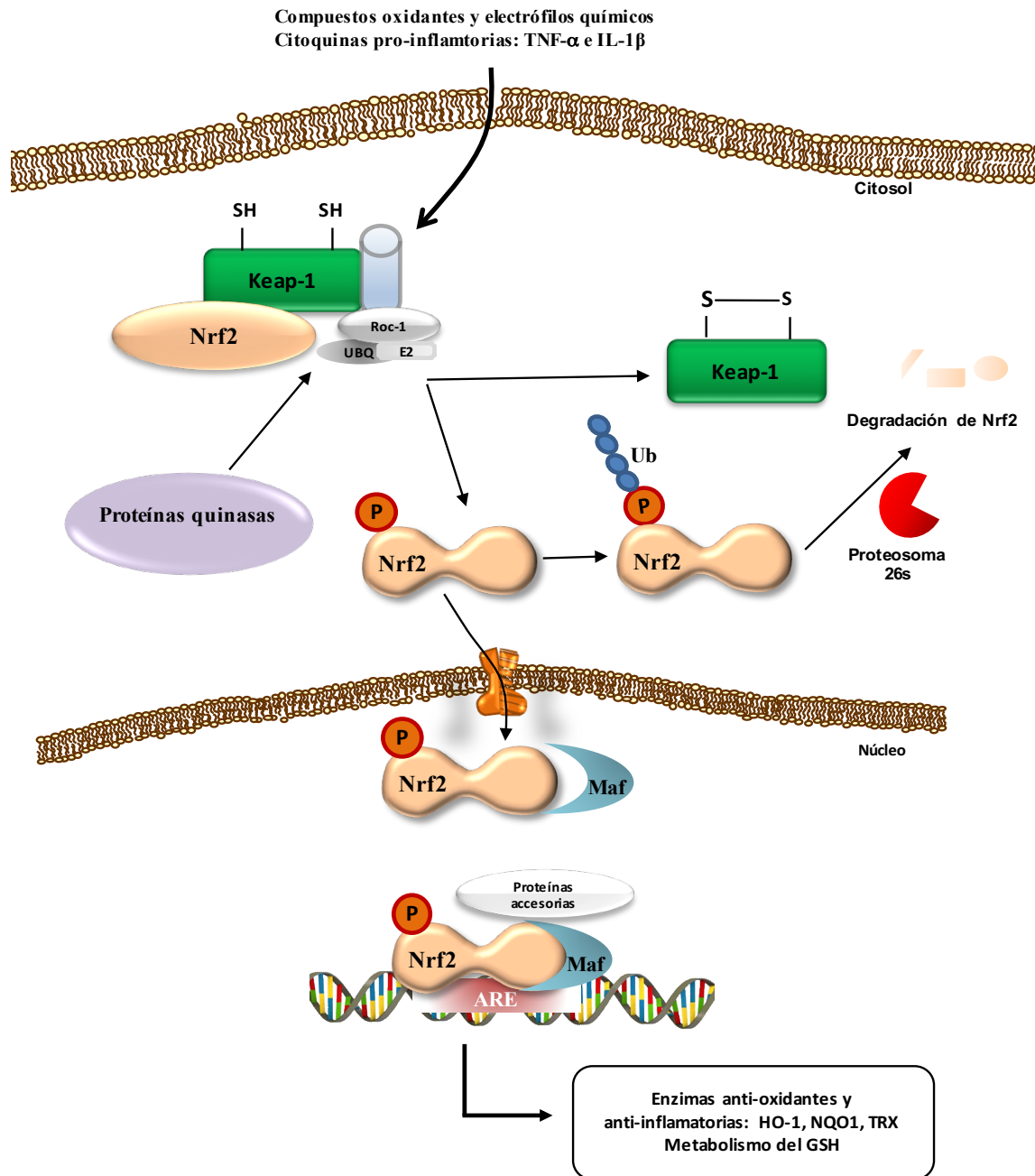


Figura 6. Esquema resumen de las vías de señalización de Nrf2.

3.5. Los BCAA y el estrés oxidativo

La asociación entre los altos niveles de BCAA circulantes y el aumento de estrés oxidativo todavía no está bien establecida. Algunos estudios recientes proponen al estrés oxidativo como uno de los mediadores implicados de neuropatología de trastornos metabólicos hereditarios, como MSUD [119]. El acúmulo en sangre de los BCAA y sus metabolitos tóxicos como las acil-carnitinas, podrían estar afectando a la homeostasis mitocondrial conduciendo a una mayor generación de ROS [120] y/o disminuyendo la funcionalidad de las enzimas antioxidantes como catalasa y glutatión peroxidasa [28].

4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES ACTIVADAS POR LOS BCAA

Es conocido que los BCAA que pueden ejercer efectos intracelulares principalmente a través de la activación del eje de señalización que implica fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato/Akt (PI3K/Akt), la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) (Figura 7).

4.1. Vía de señalización de PI3K/Akt

La vía de señalización de PI3K/Akt pertenece a la familia de proteínas serina-treonina quinasas que está implicada en la regulación de diversos procesos celulares como el metabolismo, la proliferación, la migración y la supervivencia celular [121,122]. Esta vía puede ser activada por una gran variedad de estímulos como los BCAA, IGF-I, insulina, ROS, VEGF, TGF- β entre otros muchos factores [78,123–125]. La activación de PI3K hace que esta transfiera el grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol, 4,5-bifosfato (PIP₂), generando el fosfatidil inositol, 3, 4, 5-trifosfato (PIP₃) y ADP. PIP₃ sirve como ligando para reclutar la serina/treonina quinasa Akt a la membrana plasmática. Una vez en la cara interna de la membrana, Akt es fosforilada por varias serina/treonina quinasas, resultando en su activación.

4.2. Vía de señalización de AMPK

La proteína quinasa activada por AMP o AMPK es el sensor energético de las células y juega un papel central en la detección de nutrientes y sensibilidad a la insulina. Es una proteína heterotrimérica constituida por las subunidades catalítica (α), reguladora (β) y la subunidad accesoria (γ). La AMPK se activa en condiciones de depleción energética durante el ejercicio o situación de ayuno para aumentar los procesos de generación de ATP. AMPK presenta dos residuos de fosforilación con funciones opuestas, es decir, cuando se fosforila la Thr172 se produce su activación, mientras que cuando es la Ser485/461 es la que se fosforila, se inhibe la actividad de AMPK, produciéndose una transición de los procesos catabólicos a anabólicos. Así, en modelos de ratas en ayunas se observó que la AMPK está activada, mientras que la re-ingesta de esas ratas causó una reducción aguda en la fosforilación Thr172 de en el hígado [126] y el músculo [127], acompañado con un aumento de los niveles de insulina en plasma [127,128]. La secreción de la insulina postprandial como consecuencia del exceso de nutrientes como la glucosa, los BCAA y los ácidos grasos, es considerada uno de los más importantes reguladores más importantes de la ruta AMPK. Los mecanismos de actuación propuestos son: la fosforilación directa de la Ser485/461 [128] o a través de Akt que actúa disminuyendo la activación de AMPK en el corazón y células hepáticas [129,130]. Esta reducción fisiológica en la actividad de AMPK puede tener efectos perjudiciales sobre la sensibilidad a la insulina en la hiperinsulinemia sostenida.

Curiosamente, existe una regulación inversa entre la activación de la AMPK y mTORC1. Los inductores como AICAR o metformina suprimen la fosforilación de mTOR y la consiguiente síntesis de proteínas y el desarrollo de resistencia a la insulina en células β pancreáticas incubadas con glucosa alta [131].

4.3. Vía de señalización mTOR

La diana de rapamicina en mamíferos (de sus siglas en inglés: mammalian target of rapamycin) o mTOR, es la serina/treonina quinasa conservada que forma dos complejos multiproteicos denominados, mTORC1 y mTORC2, con funciones distintas [132]. **mTORC1** se compone de proteínas mTOR, Raptor, MLST8, PRAS40 y DEPTOR; es sensible a la rapamicina y es susceptible de ser activada por diversos estímulos tales como factores de crecimiento, nutrientes, energía y señales de estrés a través de PI3K, MAPK o AMPK, con el fin de regular la síntesis de proteínas, el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia a través de sus efectores *downstream* p70S6K y 4E-BP1 [133–135].

Mientras que **mTORC2** se compone de Rictor, mSin1, Protor, mLST8 y DEPTOR; responde a factores de crecimiento, fosforilato de PKC- α , Akt (en Ser473) y paxillin para su activación y regula la actividad de las pequeñas Rac y Rho GTPasas relacionadas con la supervivencia celular, la migración y la regulación de la actina citoesqueleto [132,136].

Se ha demostrado que la sobreactivación de mTORC1/p70S6K produce resistencia a la insulina [43,128]. Aunque la activación de estas proteínas es una respuesta fisiológica a la insulina, una activación prolongada es perjudicial debido a un bucle de retroalimentación en el que S6K provoca la degradación de sustratos del receptor de insulina (IRS-1) [128], seguido de la activación de la proteína quinasa B (PKB)/Akt [137] y disminución de la captación de glucosa por bloqueo de la translocación de GLUT4 [138].

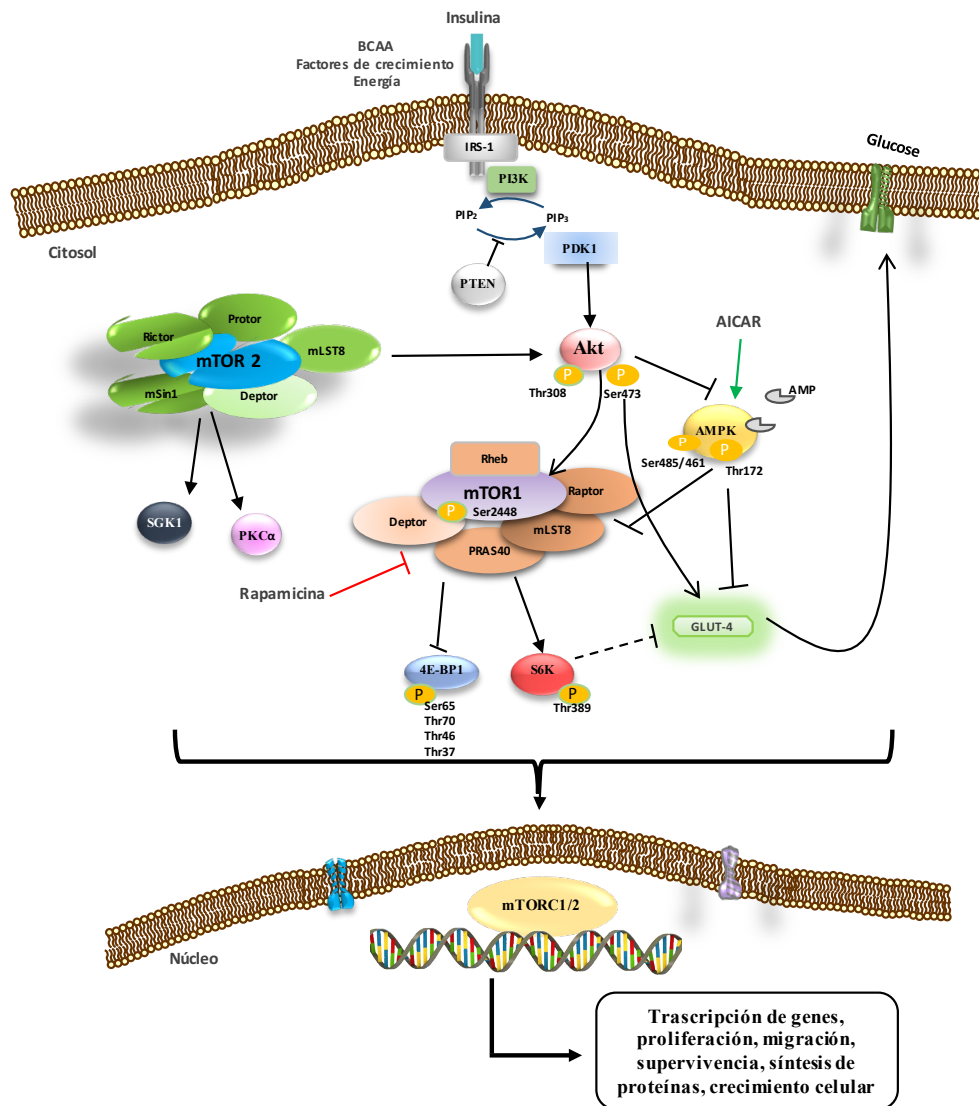


Figura 7. Esquema resumen de las vías de señalización de PI3K/Akt, AMPK y mTOR.

Debido al papel clave de la vía mTOR en la proliferación, la migración y la supervivencia celular, es una diana importante a tener en cuenta en los procesos patológicos como el cáncer y el rechazo de los órganos trasplantados.. De hecho, el inhibidor de mTORC1, rapamicina (o también llamado sirolimus), es ampliamente utilizado en la clínica con fines profilácticos en rechazo de órganos en pacientes adultos que presentan de bajo a moderado riesgo inmunológico o de forma sostenida en trasplante de riñón, en combinación con la ciclosporina o corticoides [139]. Recientemente, el uso de la rapamicina ha sido autorizado para el tratamiento de cáncer de pulmón [139,140]. Además, existen evidencias sobre la eficacia de la terapia combinada de rapamicina y la doxorrubicina en *linfomas Akt positivos* con gran resistencia a fármacos quimioterápicos [141]. Otros inhibidores de esta vía tales como

temsirolimus y everolimus están siendo probados como anticancerosos en el glioblastoma multiforme y linfoma de células de manto. En las células cancerosas, la activación de señalización mTOR también se ha relacionado con la generación de estrés oxidativo y la expresión y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, que podría proceder de la activación del factor de transcripción NF- κ B [142–144].

5. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

5.1. Estructura de la pared arterial

La estructura de los distintos tipos de arterias está adaptada a la función específica que cumplen. Aun así, la organización básica de todas las arterias es similar. Las arterias están formadas por tres capas o túnica bien diferenciadas tanto en la estructura como en la función. Desde la luz del vaso al exterior se distinguen las capas íntima, media y adventicia separadas por dos láminas de elastina: la lámina elástica interna y la lámina elástica externa. Los componentes de la pared arterial cumplen varias funciones como la de soporte mecánico, actividad vasomotora, función metabólica e interacción con los elementos de la sangre.

5.1.1. Capa íntima

Se encuentra en la parte interior de la pared del vaso en contacto directo con la sangre circulante. Se compone de una monocapa de células endoteliales y la membrana basal que limita con la lámina elástica interna (**Figura 8**). La capa endotelial regula el intercambio de sustancias con los tejidos subyacentes y lleva a cabo una intensa actividad metabólica que ejerce una influencia significativa sobre el tono vascular a través de la liberación tanto de factores vasodilatadores como vasoconstrictores [145,146].

5.1.2. Capa media

Está formada por células musculares lisas vasculares (CMLV) fusiformes dispuestas circular o helicoidalmente en capas y su característica principal es la capacidad contráctil (**Figura 8**). La capa media, además de servir como soporte muscular de la pared arterial, es la encargada de la actividad vasomotora. El aparato contráctil se encuentra en el interior de las CMLV y está formado por filamentos finos de actina y gruesos de miosina. Una característica destacable de las CMLV es la presencia de uniones tipo nexo que son uniones entre células vecinas que aseguran una unidad funcional y que facilitan la coordinación de la contracción [147]. Asimismo, las CMLV mantienen contacto con las células endoteliales a través de las fenestras de la lámina elástica interna [148].

5.1.3. Capa adventicia

La capa adventicia: es la más alejada de la luz del vaso. Está formada por tejido conectivo (colágeno y elastina), fibroblastos y mastocitos. La lámina elástica externa separa esta capa de la media (**Figura 8**). A través de la capa adventicia penetran una red de vasos de muy pequeño calibre y las terminaciones nerviosas que inervan las arterias [149]. La función principal de la adventicia es ejercer de soporte estructural de los vasos sanguíneos. No obstante, se ha sugerido que podría jugar un papel importante en la patogenia de algunas enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis [150] y la hipertensión [148,151].

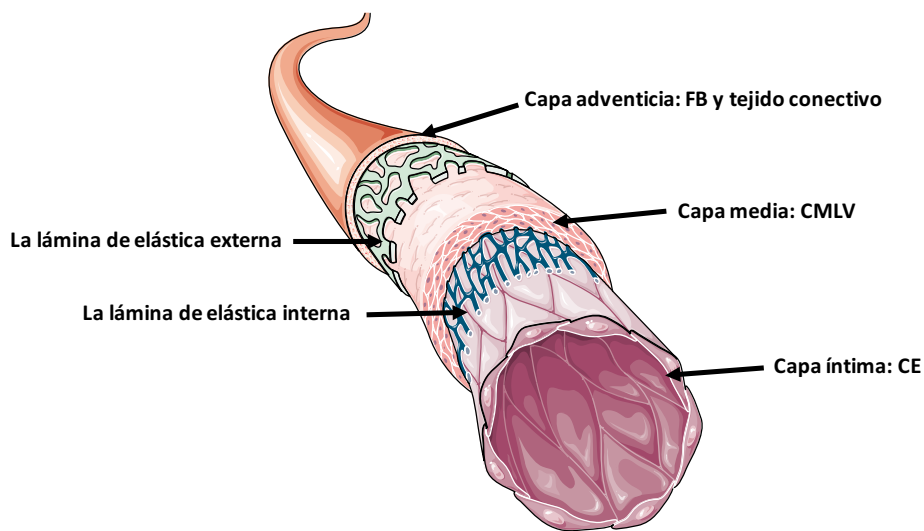


Figura 8. Diagrama representativo de la estructura de la pared arterial. CE: son células endoteliales, CMLV: son células del músculo liso vascular, FB: son fibroblastos.

5.2. Mecanismos implicados en la contracción del músculo liso vascular.

La contracción del músculo liso vascular está principalmente regulada por la concentración de calcio libre intracelular $[Ca^{2+}]_i$. Los estímulos contráctiles producen una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares como de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular.

Cuando los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ aumentan, se produce la unión del Ca^{2+} a la calmodulina (CaM). El complejo Ca^{2+} -CaM se une y activa a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). La MLCK cataliza la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC_{20}), incrementando la actividad ATPasa de la miosina, la cual interactúa con la actina e induce contracción. La terminación del estímulo contráctil provoca un descenso de la $[Ca^{2+}]_i$, lo que conduce a un descenso de la actividad de la MLCK y la MLC_{20} es defosforilada por la MLC_{20} fosfatasa (MLCP) [152].

Existen diversos los mecanismos que originan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Así, la activación de receptores acoplados a proteínas G (Gq) por agonistas de naturaleza contráctil, promueven la

activación de la fosfolipasa C (PLC) que genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2). El DAG estimula la proteína quinasa C (PKC), que participa, entre otros procesos, en la sensibilización al calcio de la maquinaria contráctil, mientras que el IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) por activación del receptor- IP_3 de la membrana del retículo. Por otra parte, tanto los canales de dependientes de voltaje que se activan por depolarización de la membrana, como los canales de acoplados a receptores, también van a contribuir al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ [153].

5.3. Factores vasoactivos que regulan el tono vascular

La regulación de tono vascular está fundamentalmente dirigida por la liberación de diversos factores vasodilatadores y vasoconstrictores por el endotelio en respuesta a estímulos neuronales, humorales y mecánicos. Entre los factores vasodilatadores se encuentran principalmente el óxido nítrico (NO), la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), de los que hablaremos con más detalle a continuación. Entre los factores vasoconstrictores se encuentran el tromboxano A_2 (TXA_2), prostanoïdes vasoconstrictores y la endotelina-1. Además, las especies reactivas de oxígeno, generadas por las tres capas de la pared vascular, participan también en la modulación del tono vascular, produciendo tanto vasodilatación como vasoconstricción en función de la especie reactiva de oxígeno y del lecho vascular [89]. Por último, el sistema renina angiotensina (SRA), participa en la modulación general del tono vascular *per se* y a través de regular la liberación de algunos de los mencionados anteriormente factores vasoactivos [154]. A continuación, se destacan las características de los factores más relacionados con este trabajo de tesis.

5.3.1. Óxido Nítrico (NO)

El NO es el mediador clave de la relajación vascular. Es un radical libre gaseoso, con una corta vida media pero muy difusible. Es generado por la óxido nítrico sintasa (NOS) en una reacción que implica la conversión de L-Arginina (L-Arg) a L-citrulina y que requiere la participación de cofactores como NADPH, flavín adenina dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH_4). Existen tres isoformas de la NOS que se diferencian en su expresión y actividad: isoforma endotelial o eNOS, principalmente expresada en células endoteliales; isoforma neuronal o nNOS, expresa en células neuronales periféricas y centrales; ambas isoformas son de expresión constitutiva y su actividad es dependiente de Ca^{2+} -CaM. La tercera isoforma es la iNOS o inducible, que fue inicialmente descrita en macrófagos, aunque ahora se conoce que también está presente en células endoteliales y en CMLV durante estados de inflamación o tras la estimulación con lipopolisacárido bacteriano, citoquinas y otros agentes

inflamatorios [155] y su actividad es independiente de Ca^{2+} -CaM [156].

- Funciones vasculares del NO:

1) Regulación del tono vasomotor. El NO generado por la eNOS en el endotelio difunde hasta las CMLV donde actúa como principal sistema vasodilatador endógeno contrarrestando la vasoconstricción producida por el sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina, a través de diferentes mecanismos. Por un lado, el NO es capaz de activar directamente canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} en algunos lechos vasculares [157]. Por otro, el NO en las CMLV actúa sobre guanilato ciclasa soluble (GCs), activando la producción de GMPc que activa a la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) que a su vez disparará una serie de reacciones de fosforilación que van a producir una disminución del nivel de Ca^{2+} intracelular y la relajación de las CMLV. Entre los mecanismos por los cuales la PKG produce relajación se encuentran: 1) la fosforilación de la quinasa de la cadena ligera de la miosina, inactivándola e inhibiéndose así la contracción; 2) la inhibición de la generación de IP_3 ; 3) la estimulación del secuestro de Ca^{2+} intracelular por el retículo sarcoplásmico por fosforilación del receptor de IP_3 del retículo; 4) la activación de la Ca^{2+} ATPasa de la membrana y del retículo sarcoplásmico; 5) la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} lo que produce una hiperpolarización de la membrana celular que conduce a una inhibición de la entrada de Ca^{2+} en la CMLV [155,158]. Además, se ha sugerido la posibilidad de que la PKG fosforile directamente los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente o las proteínas reguladoras cercanas a ellos, reduciendo la capacidad de apertura de los mismos [159].

Una variedad de estímulos como la serotonina, acetilcolina, trombina, ácido araquidónico, cambios en la presión arterial y la estimulación eléctrica son capaces de liberar NO de las células endoteliales [155]. El NO participa en la relajación dependiente de endotelio inducida por bradiquinina [160,161] y acetilcolina en diferentes lechos vasculares [162,163]. Asimismo, el NO modula las respuestas vasoconstrictoras inducidas por diferentes agonistas, como fenilefrina [164], noradrenalina [165] y H_2O_2 [166].

2) La inhibición de la agregación plaquetaria y su adhesión a la pared vascular, protegiendo contra la trombosis y previniendo la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que estimula la proliferación del músculo liso [167].

3) La inhibición del crecimiento y la proliferación de las CMLV [168].

5.3.2. Factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF)

La prostaciclina y el NO han sido identificados como los principales vasodilatadores derivados del endotelio [167,169]. No obstante, el hecho de que ni el NO ni la prostaciclina fueran responsables de la totalidad de las relajaciones inducidas por agonistas, sugirió la existencia de

un mecanismo adicional definido como endotelio-dependiente, pero NO- y prostaciclina-independiente [158]. Puesto que esta relajación dependiente de endotelio residual era simultánea con la hiperpolarización de las CMLV y se abolía por bloqueantes de canales de K^+ o por concentraciones depolarizantes de K^+ , este mediador fue denominado factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) [170].

Los mecanismos que explican como la activación de canales de K^+ activados por Ca^{2+} endoteliales permiten la hiperpolarización de las CMLV son dos: 1) la hiperpolarización de la célula endotelial se transmite directamente a las CMLV a través de uniones gap. Existe una correlación entre la expresión de uniones gap mioendoteliales y la participación de respuestas mediadas por EDHF. Así, el número de uniones gap mioendoteliales aumenta según disminuye el diámetro de la arteria, un fenómeno paralelo a la contribución del EDHF en las relajaciones dependientes de endotelio [171]; 2) la acumulación en el espacio intercelular de iones K^+ liberados desde las células endoteliales, permitiría la hiperpolarización del músculo liso por apertura de canales de K^+ o por activación de la Na^+/K^+ ATPasa [171]. Entre los candidatos propuestos como EDHF se encuentran el ácido epoxieicosatrienóico (EETs) [172] y H_2O_2 [173,174] aunque existan controversias en cuanto a sus mecanismos de acción.

5.4. Disfunción endotelial

La disfunción endotelial es una pérdida de la correcta función del endotelio debido a un desequilibrio en la biodisponibilidad de sus sustancias activas que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular. Es una característica de las enfermedades vasculares y a menudo es considerado como un evento temprano clave y que puede facilitar el desarrollo de arteriosclerosis, agregación plaquetaria, trombosis y remodelado vascular [94,98,100]. El mecanismo más predominante de la disfunción endotelial es el aumento de ROS que puede deteriorar la producción de óxido nítrico [95,101,146] y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular la hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, diabetes [175,176] (**Figura 9**).

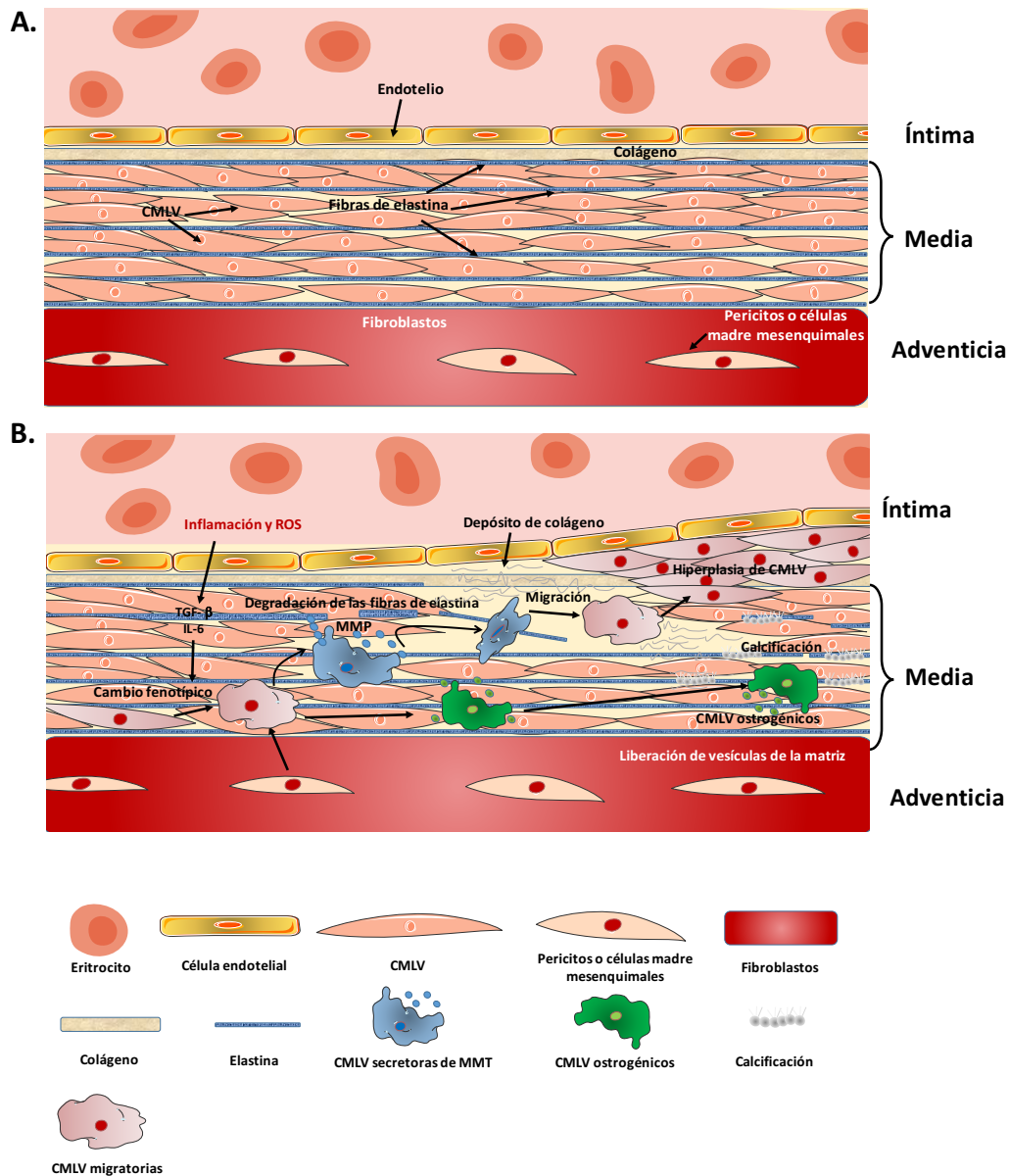


Figura 9. Mecanismos fisiopatológicos de la remodelación arterial. Vista transversal esquemática de la pared arterial en (A) situación normal o (B) durante la remodelación arterial. El engrosamiento de la pared es la característica principal de la remodelación arterial. La degradación de las fibras elásticas, la calcificación de la matriz extracelular, la deposición de colágeno y la migración celular del músculo liso vascular y el cambio del fenotipo llevan a la adaptación de la pared vascular.

5.4.1. Papel de las ROS y la inflamación en la disfunción endotelial

Las ROS pueden modular la función celular, las señales receptoras y las respuestas inmunitarias en condiciones fisiológicas, pero cuando están presentes en exceso, median el daño endotelial progresivo a través del crecimiento y la migración del músculo liso vascular [94,100] y las células inflamatorias [72], la alteración de la matriz extracelular [98], la apoptosis de las células endoteliales [95], la activación de factores de transcripción (NFκB, AP-1) [83], la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias [54,60] y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina)

[61,62,73].

Una de las fuentes más destacables de los ROS en nivel de vaso es la NADPH oxidasa y sus distintas subunidades [89,90,101,178]. De hecho, varios estudios han evaluado el papel de NOXs en el proceso de disfunción endotelial que finalmente conduce a remodelado vascular [95, 101]. Se demostró que tanto la proliferación y la apoptosis disminuyeron en los ratones NOX-1 $-/-$, aunque no existieron diferencia entre los ratones con NOX-1 sobreexpresada en comparación con ratones de tipo salvaje [95]. Además, se observó que la proliferación y la migración de CMLV procedentes de ratones NOX-1 $-/-$ se reducía en respuesta a PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), pero cuando se sobreexpresaba NOX-1 ambos procesos aumentaban, lo que sugiere que su participación en la formación de la neoíntima.

En cuanto a los mecanismos activados por el ROS derivado de NOX-1, se demostró que en presencia de algunos estímulos, la NOX-1 activa diferentes proteínas implicadas en la adhesión celular y la migración como paxilina, Rac, RhoA y cofilina [178], algunas activadas vía mTOR [132]. Además, recientemente se ha demostrado que NOX-1 participa en la expresión de la metaloproteinasa-9 de matriz, muy implicada en la migración celular [178].

Otra de las subunidades que participa en la disfunción endotelial, es NOX-2. La NOX2 está ampliamente expresada en CMLV de arterias de resistencia, en células endoteliales, adventiciales [89], linfocitos [90,105] y monocitos/macrófagos [106]. Además es el enzima cuya expresión está directamente relacionada con el factor inflamatorio implicado en el remodelado vascular. Recientemente se ha demostrado que en los ratones CD40L $-/-$ infundidos con AngII, se produjo una mejora de la disfunción endotelial ya que se correlacionaba con una menor expresión de NOX2, T-bet, E-selectina, así como disminución de la infiltración de células inmunes [179].

En otro modelo de ratones alimentados con una dieta rica en grasa se produjo una disminución de la relajación dependiente del endotelio que fue revertida al bloquear la producción de ROS NOX-2 dependientes [181].

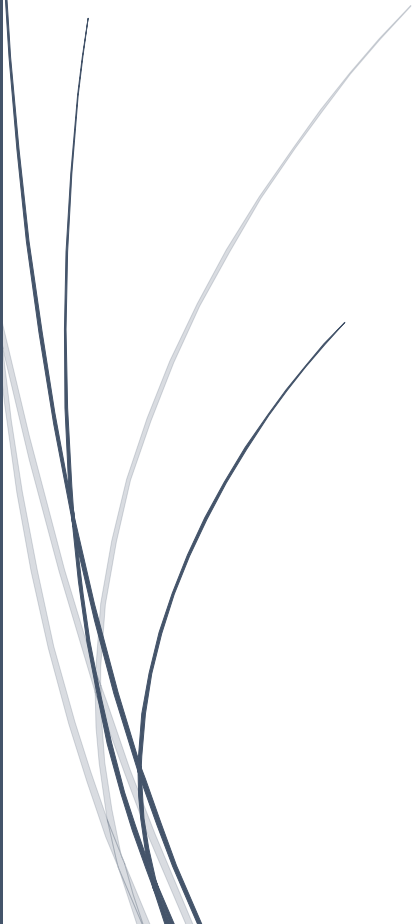
Por último, cabe destacar la importancia de NOX-4, que está ampliamente expresada en todas las células de la pared vascular. La función de la NOX-4 en las células vasculares está bajo debate [181,182]. Se cree que el NOX-4 contribuye al mantenimiento de un estado diferenciado de la célula que evita la activación o la proliferación celular [96,183,184], lo que sugiere un efecto protector de NOX-4. Sin embargo, los ratones transgénicos con sobreexpresión cardíaca específica de NOX-4 mostraron una disminución de la función ventricular izquierda acompañada de aumentada producción de anión superóxido en el corazón, así como un incremento de apoptosis y fibrosis, lo que sugiere un papel deletéreo para NOX-4 [185]. Curiosamente, los ratones NOX-4 $-/-$ desarrollaron disfunción contráctil exagerada, la hipertrofia y la dilatación

I. INTRODUCCIÓN

cardíaca durante la exposición a una sobrecarga crónica, mientras que los ratones con sobreexpresión dirigida a cardiomiocitos de NOX-4 estaban protegidos [186]. Las diferentes funciones del NOX-4 también podrían depender del modelo de la enfermedad o estímulo que se van a estudiar [183]. En el modelo de ratón infundido con AngII, las aortas de animales deficientes en NOX-4 desarrollaron la inflamación y la hipertrofia en comparación con ratón de tipo salvaje [188], sugiriendo que el NOX-4 papel protector del enzima. Además de participar en la diferenciación, la proliferación y la migración, NOX-4 tiene funciones en otros procesos implicados en el remodelado vascular como la apoptosis, la senescencia y el ciclo celular [183] y se ha sugerido que NOX-4 podría regular células fundamentales que contribuyen a cada una de estas respuestas [183].

En definitiva, el desequilibrio entre la producción de ROS, la disminución de la capacidad de neutralizarlos mediante sistemas antioxidantes, el estado pro-inflamatorio y pro-trombótico generan un bucle de retroalimentación negativa que puede contribuir alteran el tono vascular aumentando la concentración de calcio citosólico, causando especialmente una disminución de la disponibilidad de óxido nítrico e incrementando la respuesta vasoconstrictoras de las arteria. Los datos obtenidos de estudios experimentales y clínicos confirman que la vasodilatación dependiente del endotelio está alterada en muchas enfermedades que cursan con los factores negativos mencionados arriba [187].

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los BCAA son tres de los aminoácidos esenciales imprescindibles para la síntesis proteica. Los BCAA son ampliamente utilizados en suplementos nutricionales en estados de malnutrición y con el fin de evitar la caquexia muscular en los pacientes críticos y oncológicos. Además, los BCAA se utilizan comúnmente como suplementos nutricionales en deportistas con fines anabolizantes a muy altas dosis, sin conocerse los efectos colaterales de la suplementación excesiva o a largo plazo. Se ha descrito la existencia de situaciones como la enfermedad de Jarabe de Arce, la DMT2 y la obesidad, en la cuales estos aminoácidos están aumentados en suero de forma crónica causando daños neurológicos severos o la resistencia a la insulina, respectivamente. Sin embargo, la participación y los mecanismos en esas situaciones patológicas están poco estudiados.

En esta tesis, hipotetizamos que altos niveles de los BCAA son capaces de estimular la señalización por mTORC1 de forma persistente, pudiendo activar la inflamación mediante la señalización del factor nuclear- κ B y estrés oxidativo. El ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante inducido de los BCAA circulantes podrían ocasionar complicaciones patológicas.

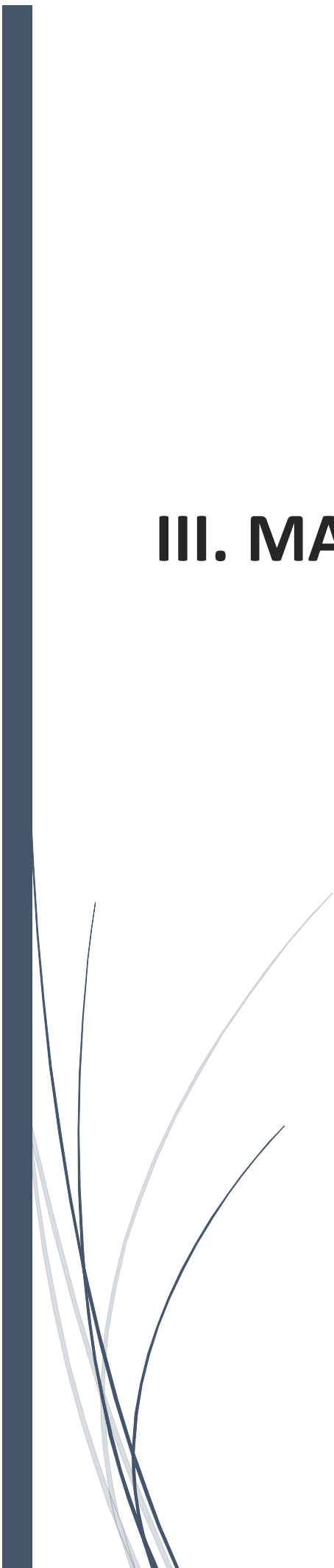
OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es investigar los posibles efectos adversos de los BCAA circulantes en sangre aumentados de forma patológica o por suplementación nutricional, así como identificar los mecanismos implicados.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Estudiar los efectos de los BCAA sobre la inflamación en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas *in vitro* e identificar las vías intracelulares de señalización implicadas.
2. Caracterizar si la señalización persistente de las vías mTORC1, AMPK y NF- κ B inducen estados pro-oxidantes y pro-inflamatorios en las PBMC.
3. Confirmar si los mecanismos identificados en PBMC se observan en células endoteliales y estudiar sus consecuencias.
4. Investigar los efectos de los BCAA en la disfunción endotelial en aorta de ratones sanos *ex vivo* y estudiar los mecanismos implicados.
5. Identificar los posibles efectos adversos de la suplementación con los BCAA comerciales de forma aguda en población sana.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Cultivo primario de células endoteliales (CE)

Las células endoteliales (CE) se obtuvieron a partir de vena safena de pacientes que operados varices de forma rutinaria, previa firma del consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Fundación Jiménez Díaz. Tras la extracción en el quirófano, la vena se guardó en solución salina a 4 °C hasta su procesamiento.

Las venas se limpiaron con PBS 1x estéril, fueron abiertas longitudinalmente con cuidado de no dañar el endotelio y cortadas en segmentos de 3-4 mm que fueron sometidos a una digestión con 1 mg/mL de colagenasa tipo I (Gibco) durante 45 min a 37 °C (resuspendida y filtrada en medio DMEM de Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co). Tras la incubación, facilitamos la extracción de células endoteliales con un raspador de plástico, y tanto el sobrenadante resultante de la digestión como las células raspadas se recogieron y centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. El pellet resultante fue resuspendido y cultivado en medio DMEM-F12 suplementado con 20 % FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina/estreptomicina, 30 µg/mL de ECGF y 0,1 mg/ml de heparina. Las placas de cultivo fueron preparadas 30 min antes con recubrimiento de gelatina 0,5 %. Tras varias semana, las CE se seleccionaron con bolas magnéticas unidas al anticuerpo específico para las mismas (CD31 Endothelial cell Dynabeads, Invitrogen). Las células se utilizaron en pases 2 a 7.

1.2. Cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron partiendo de 10 ml sangre periférica de donantes sanos de Banco de sangre de la FJD o voluntarios previa firma del consentimiento informado en ambos casos. La sangre total se depositó cuidadosamente sobre 3 ml de una solución de metrizoato sódico-Ficoll (*Lymphoprep*, MP Biomedicals, Ilikrich, France) en tubos estériles de 15 ml. Los tubos se centrifugaron durante 30 min a 2000 rpm, a temperatura ambiente sin aceleración ni freno de la centrifuga. Las PBMC se recogieron de la interfase, se lavaron dos veces en RPMI 1640 mediante centrifugación a 1800 rpm, 10 min y a temperatura ambiente. El precipitado celular se resuspendió y se cultivó a densidad de 1×10^6 - 2×10^6 /ml en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 1 % suero fetal bovino (FBS), antibióticos (100 U/m penicilina y 100 µg/ml estreptomicina) y 100 µg/ml glutamina todos adquiridos en Sigma Aldrich.

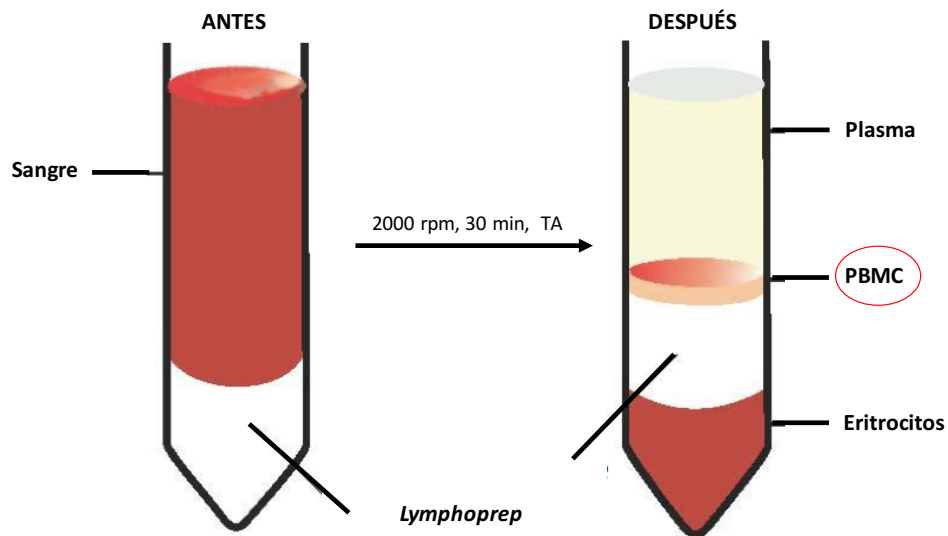


Figura 10. Imagen ilustradora de obtención de PBMC con *Lymphoprep*.

1.3. Protocolo experimental

Las CE se sembraron en las placas de 6 pocillos hasta una confluencia de 80-90 % y PBMC a concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml. En el caso de CE se sustituyó el medio completo por el de sin FBS, DMEM/F-12 (HAM) suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina 24 h previas al experimento. El medio se cambió justo antes de poner el tratamiento. Para el estudio de las rutas de señalización, la actividad NADPH oxidasa y mitoxox en CE y PBMC se estimularon con BCAA (0,2-10 mM) de Sigma Aldrich durante 5 min, 30 min y 1, 3 y 24 h y LPS (1 μ g/ml, utilizado como control positivo, Sigma Aldrich) durante 1 h. Para estudiar los efectos de BCAA sobre la expresión proteica de mTORC1 y la actividad de NADPH oxidasa en un ambiente hiperglucémico y pro-inflamatorio se han empleado los siguientes estímulos: glucosa (30 mM, Sigma Aldrich), IL-6 (10^2 U/ml) y TNF- α (30 ng/ml) de Preprotech (Preprotech, London UK).

Se estudiaron los efectos de los inhibidores específicos de la señalización por mTORC1 (rapamicina, Sigma Aldrich) y PI3K/Akt (wormanina, Sigma Aldrich) o activador específico de AMPK (AICAR, Toronto Research Chemicals) sobre los niveles de ARNm y diferentes proteínas en CE y PBMC estimuladas con BCAA (6 o 10 mM, respectivamente) durante 1 h.

Para explorar las subunidades de NADPH oxidasa que participan en su activación se han utilizado los inhibidor específico de NOX-1 (ML171, Calbiochem, La Jolla, CA) y NOX-2 (gp91dstat, Anaspec, Fremont, CA).

Para ver la influencia del estrés oxidativo mitocondrial inducido por BCAA sobre expresión proteica se ha utilizado el *scavenger* de ROS mitocondriales, mitotempo (Santa Cruz

II.MATERIAL Y MÉTODOS

Biotechnology, Inc. CA). Todos los inhibidores se añadieron durante los 30 min previos la estimulación.

El activador de Nrf2 (Sulforafano) se utilizó para explorar la influencia de esa respuesta antioxidante y antiinflamatoria sobre la expresión de p65, mitosox y la actividad de NADPH oxidasa.

Con el fin de estudiar si el estrés oxidativo y la inflamación inducido por BCAA podría tener efectos sobre la migración y la adhesión celular se han utilizados todos los inhibidores arriba mencionados, incluidos en la **Tabla 2** y explicados en la sección de resultados.

Todos los estímulos e inhibidores se prepararon en agua purificada excepto la wormanina y BAY-11-7082 que fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) y ML171 disuelto en etanol 75 %.

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN	DIANA
Rapamicina	100 nM	mTORC1
Wormanina	1 μ M	PI3K
DPI	10 μ M	NADPH oxidasa (inespecífico)
gp91dstat	5 μ M	NOX-2
ML171	0,5 μ M	NOX-1
Mitotempo	0,5 μ M	ROS mitocondriales
BAY-11-7082	1 mM	I κ B- α
ACTIVADOR	CONCENTRACIÓN	DIANA
AICAR	0,5 mM	AMPK
Sulforafano	20 μ M	Nrf2

Tabla 2. Inhibidores y activadores, concentración final y su diana.

2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.1. Extracción de proteínas totales

Las células fueron despegadas de la placa de cultivo y lavadas con solución salina fría o sedimentadas por centrifugación a 1200 rpm durante 5 min. Después se homogeneizaron con tampón de lisis frío (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 0,1 % SDS y 1 % de NP-40, 10 μ L/mL cóctel de inhibidores de proteasas y 100 μ M de ortovanadato sódico). La concentración de proteínas se cuantificó por el método del BCA (ácido bicinonínico, Pierce).

2.2. Western blot

Las proteínas procedentes de lisados celulares (25-50 μ g) se desnaturalizaron (5 min a 95 °C en tampón de carga), se separaron por electroforesis en geles de PAGE-SDS y se transfirieron a

II.MATERIAL Y MÉTODOS

membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno; Millipore). Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en TBSt (1 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl y 0.1 % Tween-20) conteniendo 5 % de leche desnatada. A continuación se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios (**Tabla 3**) durante toda la noche a 4 °C. Tras sucesivos lavados en TBSt, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de Ab mediante sucesivos lavados, las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando el kit ECL (GE Healthcare) y revelando las membranas con el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Posteriormente, las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Quantity One (Bio-Rad). Los anticuerpos frente a proteínas totales y GAPDH se emplearon como control de carga.

ANTICUERPO	DILUCIÓN UTILIZADA	CASA COMERCIAL
p-mTOR (Ser2448)	1/500	Santa Cruz Biotechnology
p-Akt (Thr308)	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
p-AMPK (Thr172)	1/1000	Cell Signaling
p-p65 (Ser536)	1/500	Cell Signaling
p-Nrf2 (Ser40)	1/1000	Biorbyt
HO-1	1/1000	Enzo Life Sciences
UCP-2 (C-terminal)	1/500	Santa Cruz Biotechnology
mTOR total	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Akt total	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
AMPK total	1/1000	Cell Signaling
eNOS	1/500	BD Transduction Laboratories
GAPDH	1/1000	Merk-Millipore
α -tubulina	1/1000	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 3. Relación de anticuerpos primarios empleados.

2.3. Inmunocitofluorescencia

Una vez finalizado el experimento, las PBMC fueron recogidas por centrifugación en eppendorf (1200 rpm, 5 min) y se fijaron con 4% paraformaldehído durante 10 min y se permeabilizaron con 0,02 % Triton X-100 durante 10 min. Después de bloquear las uniones inespecíficas con PBS conteniendo 4 % BSA y 3 % de suero, las células se incubaron durante toda la noche con los Ab primarios frente a p-p65 (1/200, NF- κ B-p65 C-20, Santa Cruz) o p-Nrf2 (1/200, Biorbyt). Al día

II. MATERIAL Y MÉTODOS

siguiente continuación se lavaron e incubaron con los anticuerpo secundarios (Alexa 488 anti conejo, 1/200; Life Technology) durante 1 h, se lavaron y los núcleos se tiñeron con 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihidroclorido (DAPI; 1/5000, Sigma Aldrich. Por último, las muestras se resuspendieron con 20 µl FluorSave (Calbiochem) y montaron. La fluorescencia se detectó mediante microscopia confocal (Confocal System TCS SP5; Leica).

2.4. Técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Para evaluar los niveles de producción de determinadas citoquinas se utilizaron ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Las concentraciones de citoquinas fueron determinadas en suero. La sangre de voluntarios sanos fue extraída en tubos que contenían agentes coagulantes y gel, después fue centrifugada a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C. Posteriormente se utilizaron 100 µl de cada muestra para determinar los niveles de IL-6 y TNF- α siguiendo las indicaciones de compañía fabricante Preprotec. Para realizar una recta patrón y poder calcular los niveles exactos de ambas citoquinas, se utilizaron diferentes concentraciones de IL-6 y TNF- α recombinantes. La absorbancia se midió en un lector de placas Perkin Elmer y expresando los valores en ng/mL.

3. ANÁLISIS de ARN

3.1. Extracción de ARN

El ARN total procedente de cultivos celulares se extrajo con Trizol (Sigma Aldrich). La cuantificación del RNA se realizó por medida de absorbancia a 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL ARN. También se comprobó si la relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm era cercana a 2, indicativo de ausencia de contaminación proteica.

3.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Para obtener ADNc realizamos una reacción de transcripción inversa a partir de 1,5 µg de RNA usando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc) con las siguientes condiciones: un primer paso con 1 ciclo de 2 min a 50 °C, un segundo paso con un ciclo de 10 min a 95 °C y un tercer paso con 40 ciclos, formado por una etapa de 15 s a 95 °C seguida de otra etapa de 60 s a 60 °C.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo mediante dos sistemas diferentes. En unos casos se utilizó el sistema de detección secuencial Taqman ABI 7700 con TaqDNA polimerasa activada por calor (Amplitaq Gold) y cebadores comerciales (base de datos de Applied Biosystems) (**Tabla 4**), realizando un paso inicial de 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, tras el cual las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Los resultados de la amplificación del gen

II. MATERIAL Y MÉTODOS

de interés se normalizaron con los datos obtenidos del control interno se utilizó el gen ribosómico eucariota (18S) amplificado en paralelo. Todas las medidas se hicieron por duplicado y se analizaron usando el programa informático 7500 System SDS Software V1.2b1c3 (Applied Biosystems).

GEN	FLUORÓFORO/ESPECIE	NÚMERO IDENTIFICADOR
IL-6	FAM/Humano	Hs00174131_m1
TNF α	FAM/Humano	Hs00174128_m1
ICAM-1	FAM/Humano	Hs00164932_m1
CD40L	FAM/Humano	Hs00163934_m1
E-Selectina	FAM/Humano	Hs00174057_m1
NOX-1	FAM/Humano	Hs00246589_m1
NOX-2 (CYBB)	FAM/Humano	Hs00166163_m1
eNOS (NOS3)	FAM/Humano	Hs01574665_m1
iNOS (NOS2)	FAM/Humano	Hs01075529_m1
HO-1 (HMOX1)	FAM/Humano	Hs01110250_m1
Nrf2 (NFE2L2)	FAM/Humano	Hs00975960_m1
18S rRNA	VIC/Eucariota	4310893E

Tabla 4. Listado de las sondas utilizadas para el análisis génico por PCR a tiempo Real.

4. ENSAYO DE UNIÓN AL ADN

4.1. Extracción de proteínas nucleares

Para estudiar la unión de la proteína activa a su secuencia consenso en el ADN se utilizó el método descrito Li et al., [188] con algunas modificaciones. Las células se homogeneizaron con 400 μ L *tampón de lisis A* frío de pH=7,9 (10 mM de HEPES; 10 mM KCl; 0,1 mM de EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF) y se dejaron lisando durante 15 min en hielo. Transcurridos esos 15 min, se añadieron 25 μ L de NP-40 al 10 % a cada tubo de muestra y se centrifugaron a 12000 rpm, 15 min. Después de la centrifugación se descartaron los sobrenadantes (proteínas citoplasmáticas) y el pellet resultante (proteínas nucleares) se resuspendieron en 50 μ L de *tampón B* frío de pH=7,9 (20 mM HEPES; 0,4 mM NaCl; 0,1 mM de EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF). La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (Thermo Fisher Scientific).

4.2. Preparación de placa

Las placas utilizadas fueron *DNA binding plates* (Corning Costar Inc., Corning, NY; Cat. N°. 2525) y se prepararon añadiendo 100 µL/pocillo de los oligos a dilución de 0,125 µM en *oligo binding buffer* de pH= 8,5 (30 mM de fosfato sódico y 1 mM de EDTA) y se dejaron a 37 °C durante 1 h. Después de 3 lavados con 200 µL/pocillo con tampón *maleato* de pH=7,5 (100 mM de maleato 150 mM de NaCl) y con el fin de evitar uniones inespecíficas a grupos amino libres, se procedió al bloqueo de 30 min a 37 °C con el tampón de bloqueo (3 % de BSA preparado en *oligo binding buffer*). Durante el bloqueo se prepararon los oligos complementarios a concentración de 50 nM en la *solución de hibridación* (3xSSC; 1% caseína, 0,1% n-laurilsarcosina; 0,02 % SDS) y se desnaturalizaron a 90°C, 10 min. Todos los oligos fueron sintetizados por Invitrogen (**Tabla 5**). La placa se lavó 3 veces con tampón *maleato* y se añadieron 100 µL/pocillo de oligos complementarios y se dejaron a 1h a 60 °C. Tras ese tiempo se hicieron 2 lavados de 5 min a 60 °C con la solución de 2xSSC y 0,1 % SDS seguida por 3 lavados con tampón *maleato*.

GEN	SECUENCIA
Nrf2	GATTCAGTCACAGTGACTCAGCAGATTCAGTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG
Nrf2c	CTAAGTCAGTGTCACTGAGTCGTCTAAGTCAGTGTCACTGAGTCGTCTTAGAC
NF-κB	TCCATGCGCTTGCTCTTCATCATCTAGCGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
NF-κBc	AGTTCAGGGGACTTTCCCAGGCGCTAGATGATGAAGAGCAAGCGCATGGA

Tabla 5. Listado de las oligos utilizadas para el ensayo de unión al ADN.

4.3. Unión de proteína al ADN

Las muestras de proteínas nucleares fueron diluidas a concentración de 10 ng/100 µL/pocillo en *DNA binding buffer* y se incubaron en la placa a temperatura ambiente durante 1h. Tras 3 lavados con *solución de lavado* (100 mM de maleato; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween20), la placa se incubó con anticuerpo primario para p-p65 (1/200, Cell Signaling, Boston, MA, USA) y p-Nrf2 (1/200, Biorbyt, United Kingdom), 1h a temperatura ambiente. Tras lavados sucesivos, la placa se incubó con los correspondientes anticuerpos secundarios generado en burro frente a IgG de conejo Alexa 488 para p65 o Alexa 633 para Nrf2 (1/2000, Life Technology) durante 1h a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de Ab se midió la fluorescencia en el lector de placa de (Enspire, Perkin Elmer). Los datos se expresaron como intensidad de fluorescencia (488 o 633, respectivamente) y se normalizaron con respecto al control.

5. MEDIDA DE ESTRÉS OXIDATIVO

5.1. Detección de ROS por fluorescencia

Para la detección de anión superóxido mitocondrial *in vitro* en PBMC fue analizada mediante tinción con la sonda fluorescente Mitosox red (Life Technologies). Las células, tras ser tratadas con inhibidores y estímulos correspondientes, se incubaron en oscuridad con 0,5 μ M Mitosox durante 30 min a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂. Se realizó el análisis cuantitativo y cualitativo de la fluorescencia. Para análisis cualitativo de ROS mitocondriales la fluorescencia se detectó mediante microscopia confocal (Confocal System TCS SP5; Leica). Una vez finalizado el experimento y la incubación con Mitosox, las PBMC fueron recogidas mediante centrifugación en tubos eppendorf (1200 rpm, 5 min), se contrastaron con DAPI y se montaron con FluorSave. Para análisis cuantitativo, las células fueron cultivadas en placa negra de 96 pocillos a densidad $0,3 \times 10^6 / 300 \mu$ l y tras 30 min de incubación con Mitosox la fluorescencia fue medida en un lector de placa (Enspire Perkin Elmer) a $\lambda_{\text{excitación}}=510$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=580$ nm. La actividad se expresó como unidades fluorescencia/número de células. Como controles se utilizaron las muestras de células no estimuladas y las variaciones de la fluorescencia de Mitosox Red se calculó como actividad relativa con respecto a los controles.

5.2. Actividad NADPH oxidasa

Para determinar la actividad NADPH oxidasa total en homogenados de PBMC o CE se utilizó el ensayo de quimioluminiscencia lucigenina. Las células se homogeneizaron en tampón fosfato (50 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, sacarosa 150 mM, pH 7,4). La reacción se inició mediante la adición de NADPH (0.1 mM) a la suspensión que contenía muestra resuspendida en tampón fosfato y lucigenina (5 mM). La luminiscencia se midió en luminómetro de placa (Enspire Perkin Elmer). Se restó la luminiscencia basal de cada lectura. La actividad se expresa como unidades relativas de luz/mg de proteína. Como controles se utilizaron las muestras de células no estimuladas y las variaciones de la actividad de NADPH oxidasa se calculó como actividad relativa con respecto a los controles.

5.3. Medida de la producción de O₂^{•-} en células en cultivo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Este estudio se realizó en células en cultivo. Las células en cultivo, una vez finalizado cada tratamiento, se equilibraron en KHS-HEPES (30 min, 37 °C), se incubaron en KHS-HEPES con DHE (5 μ M, 30 min, 37 °C), se recogieron en eppendorf y se sedimentaron. Tras la homogeneizadas en acetonitrilo, las células fueron sonicadas (2 pulsos de 5 min cada uno), centrifugado (12000 rpm; 15 min a 4 °C) y el sobrenadante resultante recolectado. Seguidamente, se secó el sobrenadante en una bomba de vacío y el *pellet* obtenido se resuspendió en 50 μ l de KHS-DPTA (100 μ M). Para eliminar impurezas, las muestras se filtraron y se utilizaron 2 μ l de cada una para

II. MATERIAL Y MÉTODOS

determinar la concentración de proteínas por el método del BCA. Por último, 4 µg de cada muestra se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; Agilent Technologies), utilizando una columna de fase inversa C-18 (Kinetex), un gradiente utilizando como fase móvil A (acetonitrilo puro) y B (H₂O/acetonitrilo 10 %/ácido trifluoroacético 0,1 %; v/v/v) como fase estacionaria, con un flujo de 0,4 ml/min y siguiendo la metodología descrita en otros estudios [189,190]. La producción de Etidio (E⁺) y de 2-hidroxietidio (2-OH-E⁺) fue monitorizada mediante fluorescencia a 480/580 nm excitación/emisión.

Para optimizar el análisis por HPLC, se hizo una incubación a 37 °C durante 30 min de DHE (5 µM) y Xantina/Xantina Oxidasa (en un ratio de 0-50 µM y 0,1 U/ml). La incubación se realizó en un buffer compuesto por (en mM) 7,78 Na₂HPO₄; 2,20 KH₂PO₄; 140 NaCl y 2,73 KCl; a pH 7.4 y con DTPA/PBS (100 µM). Posteriormente, se analizaron las muestras mediante HPLC con el fin de obtener las condiciones óptimas para detectar los diferentes subproductos de la oxidación del DHE, y para poder determinar el pico que representa al producto derivado de la oxidación del DHE inducida específicamente por el O₂^{•-} (2-OH-E⁺).

5.4. Medida del potencial de membrana mitocondrial

Para medir la despolarización de la membrana mitocondrial se utilizó la sonda fluorescente tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM), que proporciona información sobre la despolarización de la membrana mitocondrial. Para ellos, las PBMC se trataron con los inhibidores (30 min) y estímulo (1h) correspondientes (explicado en la sección de resultados) y después se incubaron con 150 µmol/L de TMRM (Life Technologies) a 37 °C durante 10 min. La suspensión de células se analizaron con un citómetro de flujo a 549 nm (FACScan; BD Biosciences, San Jose, CA). Para cuantificar la despolarización de la membrana se utilizó el porcentaje de fluorescencia correspondiente a células muertas con respecto al control de la población total como de población de los monocitos y los linfocitos por separado.

6. ENSAYOS FUNCIONALES

6.1. Ensayo de migración

El ensayo de migración se realizó mediante el uso de placas transwell de 24 pocillos y 8 µm de poro (Corning Costar Inc., Corning, NY). Las PBMC se resuspendieron a una concentración de 0,5x10⁶ células y se colocaron en la parte superior de los insertos en presencia o ausencia distintos inhibidores (explicados en la parte de los resultados). Tras la incubación durante 30 minutos con los inhibidores en los casos que lo requería el experimento, en la parte inferior se añadió medio RMPI-1640 conteniendo el estímulo BCAA (10 mM) o LPS (1 µg/ml, utilizado como control positivo), permitiendo migrar a las PBMC hacia estos pocillos durante 1 hora a 37°C. Las células adheridas al otro lado de la membrana porosa se fijaron con 4% paraformaldehído y se

II. MATERIAL Y MÉTODOS

tiñeron con DAPI (1:50000). Se cuantificaron tres campos al azar para cada inserto mediante microscopía confocal (Leica TCS SP2, objetivo 40x).

6.2. Adhesión celular

Para el ensayo de adhesión celular, las CE (1×10^4) se sembraron en placas de 96 pocillos y estimularon con BCAA en presencia o ausencia de distintos inhibidores (explicados en la parte de los resultados). Tras la incubación durante 30 minutos con los inhibidores en los casos que lo requería el experimento, las CE se estimularon con BCAA (6 mM) durante 1 h. Por otro lado, las PBMC se marcaron con 5 μ M calceína-AM (Sigma) durante 30 min a 37 °C. Se añadieron 1×10^5 PBMC/pocillo y se coincubaron con las CE durante 30 min. Las células no adherentes se retiraron y las PBMC adheridas se lisaron en 0,1 % SDS y fluorescencia de cada pocillo se midió a $\lambda_{\text{excitación}}=485$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=530$ nm. La capacidad de adhesión se calculó como fluorescencia/proteína relativa con respecto a los controles.

7. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

7.1. Animales empleados

Los estudios *ex vivo* se realizaron con ratones machos de 11 semanas de edad (cepa C57BL/6J; Charles River) siguiendo la normativa europea y nacional vigente (Directiva 2010/63/EU, Recomendación 2007/526/EC y Real Decreto 53/2013) y fueron previamente aprobados por el Comité Ético de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y la Dirección General del Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (PROEX 345/14). Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO y se procedió a la obtención de la aorta, la cual se introdujo en una solución de Krebs-Henseleit (KHS) oxigenada con una mezcla de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ y mantenida a 4 °C.

Para estudiar la reactividad vascular se utilizó el método descrito por Mulvany y Halpern (1977) [193]. Para ello, segmentos de la aorta de aproximadamente 2 mm de longitud se transfirieron a un baño de órganos de un miógrafo dual isométrico (Danish Myo Technology, Dinamarca), en el cual, dos alambres de acero de 40 μ m de diámetro se introdujeron por la luz de la arteria (**Figura 11**).

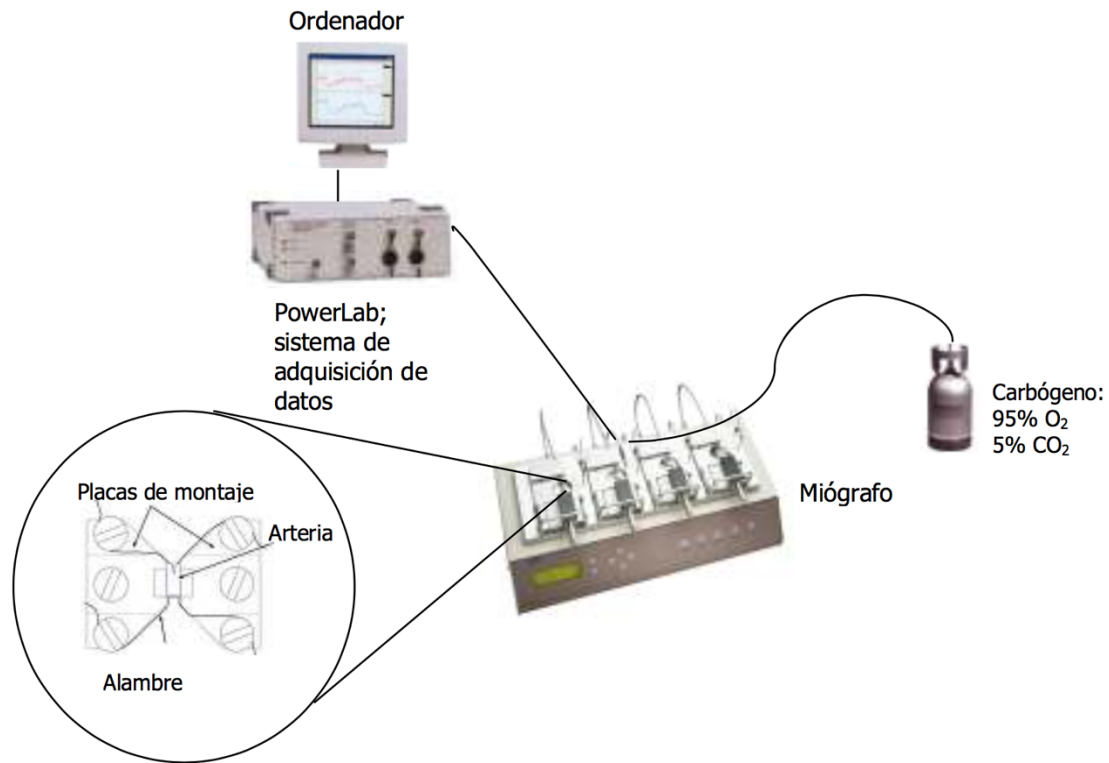


Figura 11. Esquema representativo del miógrafo de alambres donde se realizaron los experimentos de reactividad vascular.

Después de un periodo de estabilización de 30 min en KHS a 37 °C y pH de 7,4 las arterias se estiraron gradualmente hasta conseguir su tensión óptima en función de su diámetro. Para ello, en cada segmento arterial, se determinó la relación entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso y, a partir de ella, la circunferencia interna correspondiente a una presión transmural de 100 mm Hg para un vaso relajado in situ (L100) (Mulvany y Halpern, 1977) [191]. Para la realización de los experimentos, las arterias se situaron con una circunferencia interna L_I , siendo $L_I = 0,9 \times L100$, circunferencia a la cual el desarrollo de fuerza es máximo. El diámetro de las arterias se determinó como $l_I = L_I/\pi$. Una vez acabado el proceso de normalización, los segmentos arteriales se lavaron y se equilibraron durante 30 min. A continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de los mismos a una solución de alta concentración de potasio (K^+ -KHS 120 mM).

7.2. Protocolos experimentales

En primer lugar se determinó la presencia de endotelio funcional por la capacidad de 10 μ M de acetilcolina de producir relajación en arterias previamente contraídas con fenilefrina hasta una contracción de aproximadamente el 50 % de la contracción del K^+ -KHS. Se consideraron segmentos con endotelio funcional aquellos que se relajaron con acetilcolina más de un 70 % del tono previo.

II.MATERIAL Y MÉTODOS

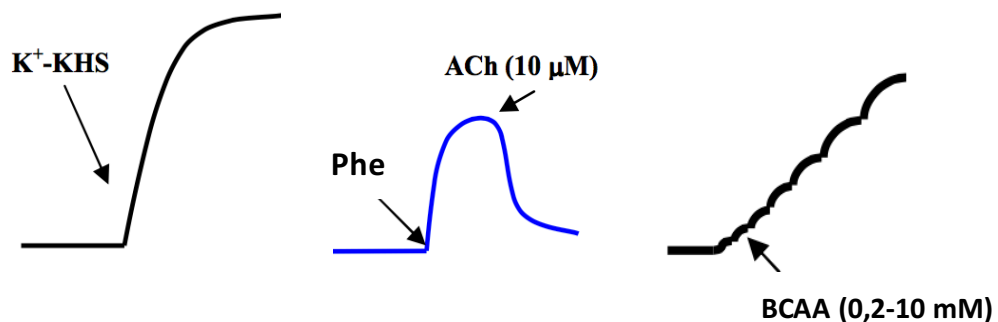
Una vez comprobada la presencia de endotelio, se realizó una curva concentración respuesta a BCAA (0,2-10 mM) (**Figura 12A**). En otro grupo de arterias, se realizó una curva concentración respuesta a BCAA en segmentos previamente contraídos con fenilefrina a la concentración suficiente para alcanzar una contracción de aproximadamente el 50 % de la contracción del K^+ -KHS, en ausencia (curva control) o en presencia de diferentes fármacos, los cuales se administraron 30 min antes de realizar la curva concentración-respuesta a BCAA (**Figura 12B**).

Para determinar el papel del endotelio en la contracción inducida por BCAA y analizar el papel del NO en la respuesta contráctil inducida por los mismos. Con el fin de eliminar la interferencia del NO derivado del endotelio, se estudió el efecto producido por L-N_G-nitroarginina metil éster de Sigma Aldrich (L-NAME, 100 μ M), inhibidor no selectivo de la NOS, sobre dicha respuesta.

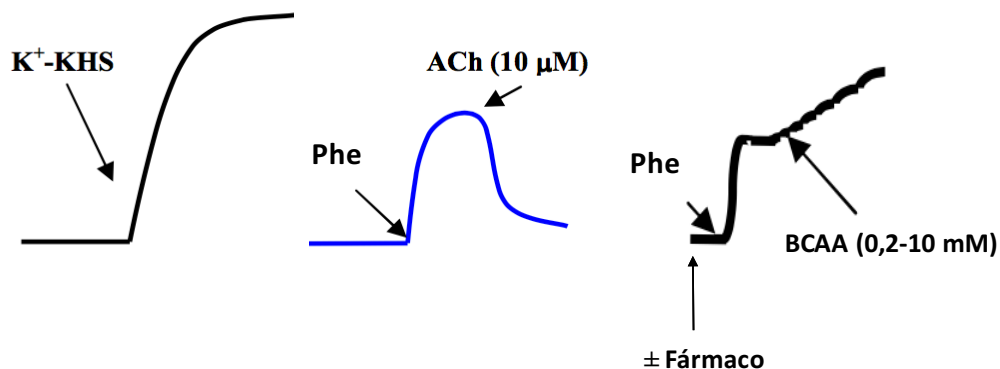
Para determinar el papel del anión superóxido en la contracción inducida por BCAA, se utilizó el análogo de la superoxido dismutasa dirigido a la mitocondria, mitotempo (0,5 μ M, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA) y los inhibidores selectivos de subunidades del enzima NADPH oxidasa, gp91dstat (inhibidor de NOX-2; 5 μ M, Anaspec, Fremont, CA) y ML171 (inhibidor de NOX-1; 0,5 μ M Calbiochem, La Jolla, CA).

Finalmente, para estudiar el papel del peróxido de hidrógeno en dicha respuesta contráctil a BCAA, se utilizó la enzima detoxificadora del mismo catalasa (1000 UI/ml, Sigma Aldrich) (**Figura 12C**).

A.



B.



C.

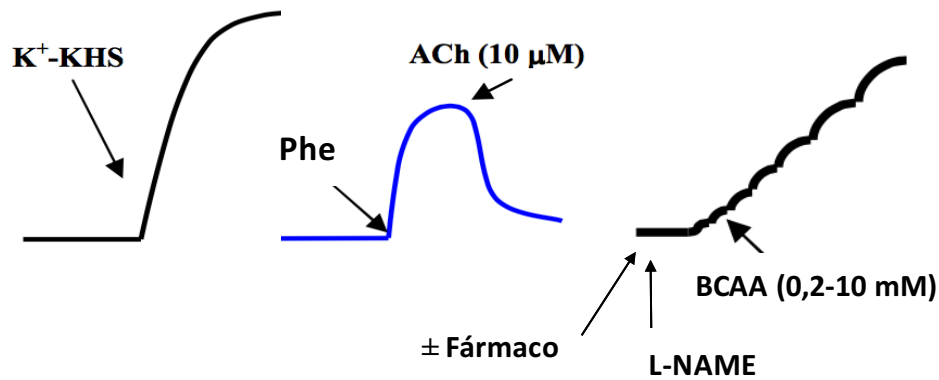
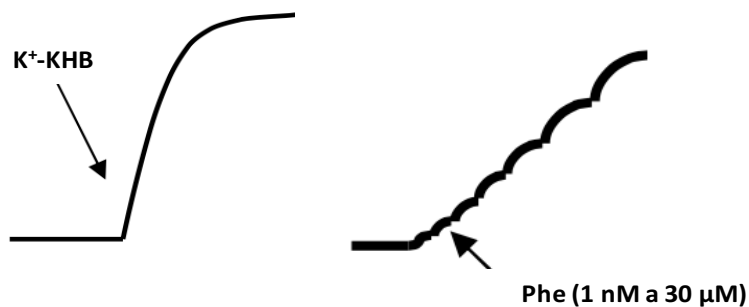


Figura 12. Esquema representativo del protocolo experimental realizado en los experimentos de reactividad vascular en aortas de ratones WT. Phe=fenilefrina, ACh=acetilcolina.

En otro grupo de experimentos los segmentos de aortas se incubaron durante 24 h en medio RPMI-1640 suplementado con 1 % suero fetal bovino (FBS) y 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina y 100 µg/ml glutamina a 37 °C en una atmósfera húmeda compuesta por 95 % de aire y 5 % de CO₂, en ausencia (control) o en presencia de BCAA (6 mM). Transcurrido dicho período, las arterias se montaron en el miógrafo como se ha descrito anteriormente y se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina (1 nM-30 µM; **Figura 13A**) o a ACh (1 nM-10 µM; **Figura 13B**) en segmentos pre-contráidos previamente con fenilefrina como se ha descrito anteriormente. Finalmente, para evaluar la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta al donador exógeno de NO, diethylamina NONOato diethylammonio (DEA-NO, 1 nM-10 µM; **Figura 13C**) en los segmentos precontraídos previamente con fenilefrina.

A.



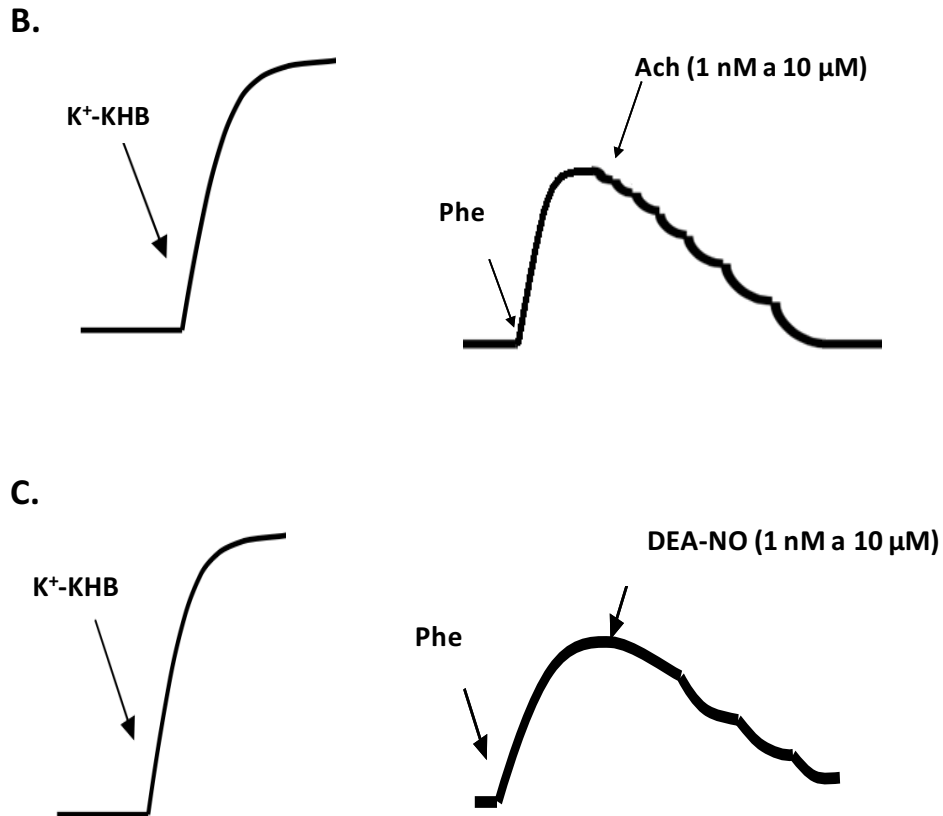


Figura 13. Esquema representativo del protocolo experimental realizado en los experimentos de reactividad vascular en aortas de ratones incubadas 24 horas. (A) Curva de contracción a Phe, (B) curva de relajación a Ach y (C) curva de relajación a DEA-NO.

8. ENSAYO CLÍNICO

Título: "Ensayo clínico exploratorio para evaluar el efecto de suplementos de amino ácidos alifáticos de cadena ramificada (BCAA) sobre la inflamación y el estrés oxidativo en individuos sanos y con síndrome metabólico". Aprobado por el Comité Ético de investigación clínica de FJD. Es un ensayo clínico no aleatorizado, exploratorio, abierto, con suplemento nutricional comercial.

8.1. Criterios de inclusión

Jovenes sanos con edades comprendidas entre 18 y 45 años, IMC<25 y realizar más de 3 h de ejercicio moderado/semana.

8.2. Criterios de exclusión

- Imposibilidad de acudir al seguimiento clínico pre-establecido
- Institucionalización del participante (que habite en residencias o centros de larga estancia)
- Antecedentes quirúrgicos para bajar de peso o intención de someterse a cirugía en los próximos 12 meses
- Historia de enfermedad inflamatoria crónica

II.MATERIAL Y MÉTODOS

- Trastorno psiquiátricos graves: esquizofrenia, trastorno bipolar, trastornos de la conducta alimentaria, depresión con hospitalización en los últimos 6 meses
- Toda condición severa de comorbilidades con menos de 24 meses de esperanza de vida
- Consumo problemático de alcohol o abuso de drogas en los últimos 6 meses
- Tratamiento actual con corticoides, inmunosupresores o agentes tóxicos
- Participación simultánea en otro ensayo clínico aleatorizado
- Infección aguda o inflamación, inmunodeficiencia o estado VIH positivo, cirrosis o insuficiencia hepática
- Cáncer activo o antecedentes de tumores malignos en los últimos 5 años
- Pacientes con patologías médicas o quirúrgicas que a criterio del investigador no permitan su participación en el estudio
- Contraindicaciones para el uso de suplementos de BCAA o sus excipientes

8.3. Los resultados obtenidos son de los dos grupos de participantes

1. Grupo control (denominado como “C” en la sección de resultados) que no tomó ningún suplemento, pero tuvo restricciones en su dieta: no tomar antioxidantes ni antiinflamatorios durante 7 días y apuntar todos los alimentos considerados fuente de BCAA en una lista que se le proporcionó. El grupo se compuso de 10 participantes (5 hombres y 5 mujeres).
2. Grupo de tratamiento a los que durante 7 días se les administró 6g de BCAA (denominado como “BCAA” en la sección de resultados). Además tenían las mismas restricciones en la dieta que el grupo “C”. En ambos grupos se determinaron todos los parámetros seleccionados a los días 0 y 7. El grupo de sujetos tratados también incluyó 10 participantes (5 hombres y 5 mujeres). En ambos grupos se tomaron muestras de sangre el día 0 y día 7 para realizar un análisis completa y analizar los parámetros del estrés oxidativo e inflamación en PBMC y suero, respectivamente.

8.4. La determinación de los BCAA en suero

La determinación de las concentraciones de BCAA en suero se realizó por espectroscopia de masas en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la UAM. La sangre de voluntarios sanos fue extraída en tubos que contenían agentes coagulantes y gel, después fue centrifugada a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se utilizaron 150 µl de cada muestra que se depositó sobre papel absorbente (*Whatman 903*) dando lugar a una mancha y se dejó secar durante 1 h. Posteriormente se obtuvieron 2 recortes de 5,5 mm de diámetro de la “gota seca” que se pusieron en contacto con 100 µl de metanol puro, 30 min a TA y agitación constante. El extracto metanólico obtenido que contenía aminoácidos se envió para su análisis al SIdI. Para

II.MATERIAL Y MÉTODOS

realizar una recta patrón y poder calcular los niveles exactos de BCAA, se utilizaron diferentes concentraciones BCAA.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como media \pm error estándar (EEM) del número total de experimentos (estudios *in vitro*) o de animales (estudios *in vivo*). El análisis estadístico se realizó con el programa *Prism 5 (Graphpad Software)* empleando la prueba no paramétrica (Mann-Whitney) y test de Kruskal-Wallis o el test de ANOVA (una o dos vías) seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples y considerando diferencias significativas aquellas con valores de $P < 0.05$



IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

PARTE 1: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE BCAA *IN VITRO* EN CÉLULAS MONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) DE SUJETOS SANOS

Estudios metabolómicos previos relacionaron la presencia de elevadas concentraciones séricas de los BCAA en sujetos obesos y diabéticos con el aumento de resistencia a la insulina y aparición de DMT2 futura [39,40,44]. Además, la deficiencia genética en el complejo multienzimático de la deshidrogenasa de alfa-cetoácido de cadena ramificada (BCKDH) da lugar a la enfermedad del Jarabe de Arce (MSUD), caracterizada por elevados niveles sanguíneos de estos aminoácidos causando severos daños neurológico en estos pacientes [24,28]. A pesar de conocerse los daños producidos por el aumento de los BCAA, los mecanismos por los cuales actúan siguen siendo desconocidos. Por ello, el primer objetivo de este trabajo se centró en explorar los mecanismos y rutas intracelulares por los cuales concentraciones elevadas de BCAA pueden causar daños en las células.

1.1. Los BCAA inducen estrés oxidativo de manera tiempo y dosis dependiente

Inicialmente se exploró el impacto que tienen los BCAA en dos de las fuentes más importantes de la producción de las especies reactivas de oxígeno, la actividad de NADPH oxidasa y la mitocondria. En primer lugar, las PBMC fueron expuestas a concentraciones crecientes de BCAA (4-12 mM), concentraciones que se encuentran en los pacientes con MSUD [24,28] o en experimentos *in vitro* en células cancerosas [192-195]. En estas condiciones, los BCAA fueron capaces de inducir de forma significativa tanto la actividad de la NADPH oxidasa como la generación del anión superóxido mitocondrial observándose el máximo efecto con 10 mM después de 1 hora de estimulación (**Figuras 14A y 14B**).

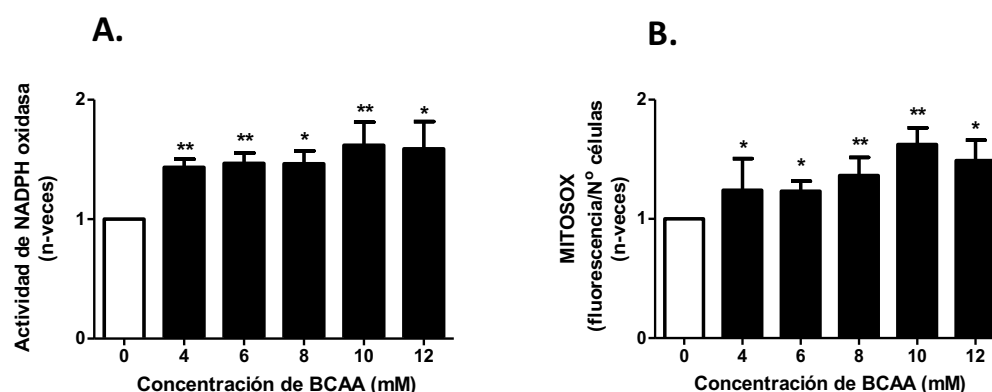


Figura 14. Los BCAA inducen estrés oxidativo de manera dosis dependiente. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de BCAA (4-12 mM) durante 1h para estudiar: la actividad de NADPH oxidasa (**A**) y la generación de radicales superóxido mitocondrial detectados por el indicador fluorescente Mitosox (**B**). Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 6-8 experimentos independientes. *P<0.05; **P<0.01 vs Control.

IV. RESULTADOS

Sin embargo, cuando se realizaron los experimentos de tiempo-respuesta se observó que máxima generación de ROS por ambas fuentes fue producida a 1 hora con 10 mM (**Figuras 15A y 15B**).

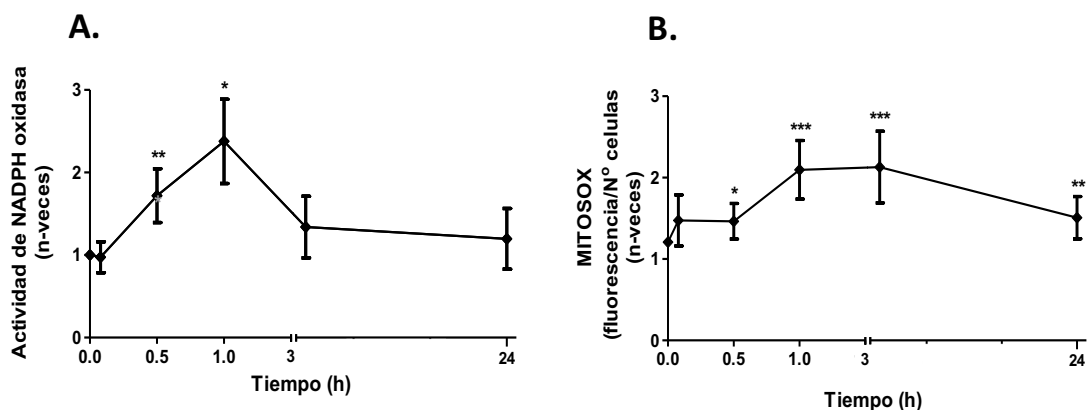


Figura 15. Los BCAA inducen el estrés oxidativo de manera tiempo dependiente. Las células fueron estimuladas con 10 mM de BCAA para realizar la curva tiempo respuesta durante periodos de tiempo desde 0 a 24 horas y estudiar **(A)** actividad de NADPH oxidasa y **(B)** Mitosox. Los valores se expresaran como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 6-8 experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs; *** $P < 0.01$ Control.

Con el fin de demostrar la producción del anión superóxido de forma más específica, se empleó la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), mediante la cual se pudo determinar la producción del producto específico de la oxidación de DHE, 2-hidroxoetidio (2-OH-E⁺). Los resultados obtenidos de cromatogramas de HPLC mostraron que los BCAA a 1 hora y 10 mM fueron capaces de producción aumento significativo del componente específico 2-OH-E⁺ (**Figura 16**).

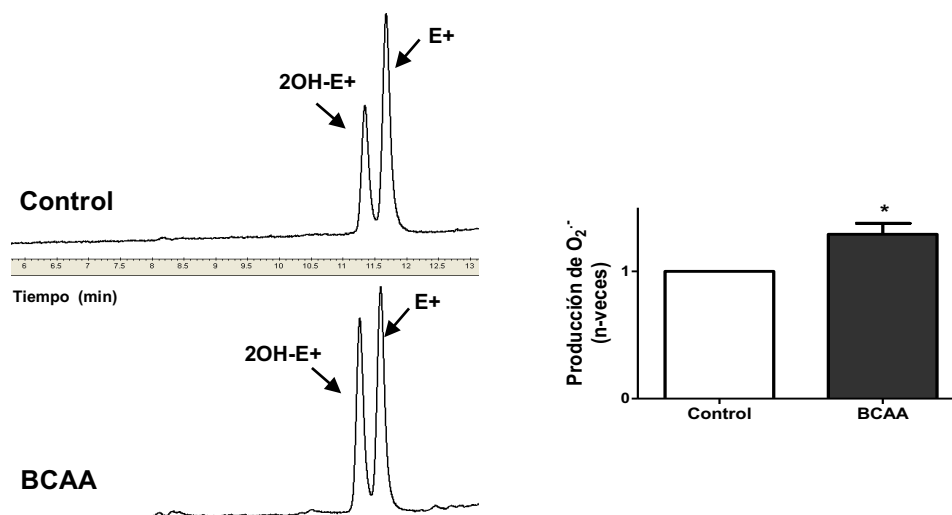


Figura 16. Medida de la producción de anión superóxido por HPLC. Cromatogramas y cuantificación (gráfica) de la producción O₂⁻ por DHE fluorescente. Los valores se expresan como incremento área del pico específico (2-OH-E⁺) con respecto inespecífico (E⁺); Media \pm EEM de 5 experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs Control.

IV. RESULTADOS

Debido a que las concentraciones séricas de BCAA en pacientes obesos y DMT2 se encuentran en un rango entre 0,3-0,5 mM, se quiso explorar qué efectos podrían tener estos aminoácidos a bajas concentraciones sumadas a condiciones de hiperglucemia e inflamación tan características en estas patologías. Para ellos, las PBMC fueron estimuladas con una combinación de alta concentración de glucosa (30 mM), citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, 10^2 U/ml o TNF- α , 30 ng/ml) y BCAA (0,5 mM). Los resultados obtenidos demostraron que bajo esas condiciones experimentales, los BCAA pueden inducir producción de $O_2^{\bullet-}$ a concentraciones mucho más bajas, pero similares a las observadas en la sangre de los pacientes (**Figura 17**).

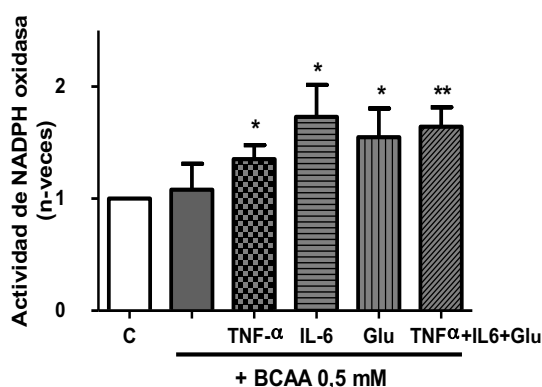


Figura 17. Los BCAA inducen el estrés oxidativo a concentraciones muy bajas en un ambiente hiperglucémico y pro-inflamatorio. Las células fueron estimuladas durante 1h con BCAA 0,5 mM en presencia o ausencia de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, 10^2 U/ml o TNF- α , 30 ng/ml) y alta concentraciones de glucosa (Glu, 30 mM) para estudiar la actividad de NADPH oxidasa. Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 6 experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control.

1.2. Los BCAA estimulan la vía de señalización PI3K/Akt-mTORC1

Los BCAA actúan como señales nutricionales activando la cascada de señalización de mTORC1, habiéndose estudiado fundamentalmente en células cancerosas [194,195]. En el presente estudio se investigó si los BCAA *per se* son capaces de activar esta vía de señalización en PBMC y sus consecuencias funcionales. Inicialmente se realizó la curva dosis y tiempo respuesta para ver la fosforilación de mTORC1. El rango de concentraciones utilizada fue desde 0,2 hasta 12 mM, concentraciones que engloban las encontradas previamente en el suero de pacientes diabéticos y obesos, así como las propias de una enfermedad genética (MSUD). Como se puede observar en la **Figura 18A**, los BCAA indujeron de manera significativa la fosforilación de mTORC1 con máximo efecto a la concentración de 10 mM. Sin embargo, cuando los PBMC fueron expuestos a condiciones hiperglucémicas y pro-inflamatorias, los BCAA fueron capaces de inducir la fosforilación a concentraciones más bajas (0,5 mM) (**Figura 18B**).

IV. RESULTADOS

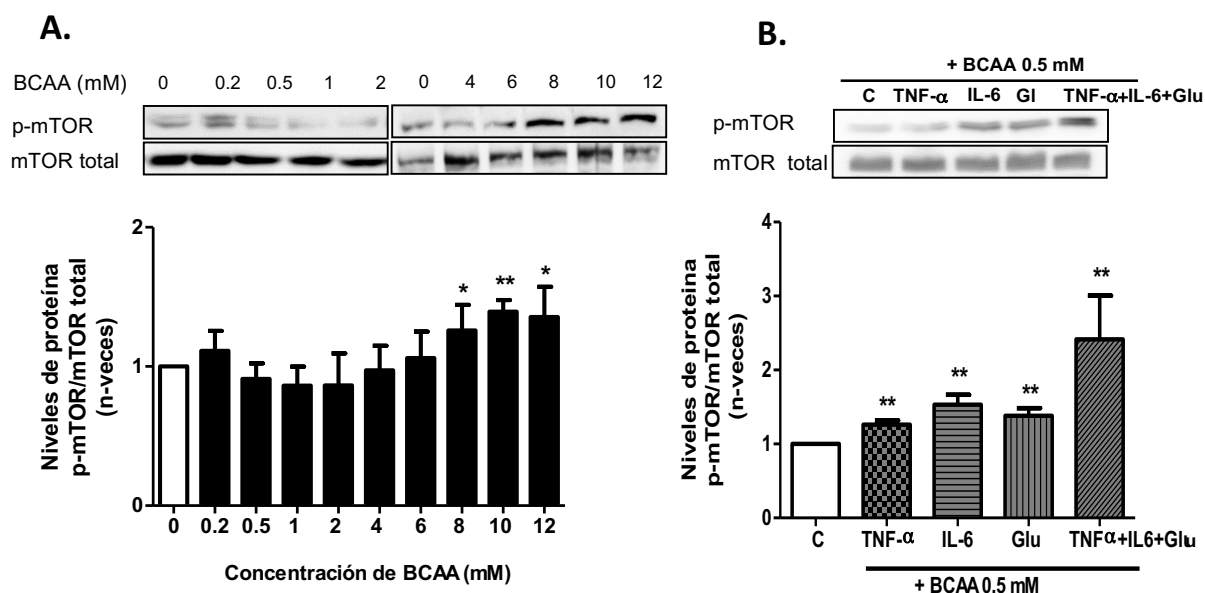


Figura 18. Activación de la ruta de señalización de mTORC1 por los BCAA. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de BCAA (0,2-12 mM) (**A**) y con BCAA (0,5 mM) en presencia o ausencia de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, 10^2 U/ml o TNF- α , 30 ng/ml) y alta glucosa (Glu, 30 mM) (**B**) durante 1h para estudiar la fosforilación de mTORC1 mediante western blot. Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 6-8 experimentos independientes. *P<0.05, **P<0.01 vs Control.

Los resultados de experimentos de tiempo-respuesta mostraron que el tiempo óptimo de la estimulación con BCAA (10 mM) para varias las proteínas ensayadas fue de 1 hora (**Figura 19**), en concordancia con lo descrito anteriormente en otros tipos celulares [193-195].

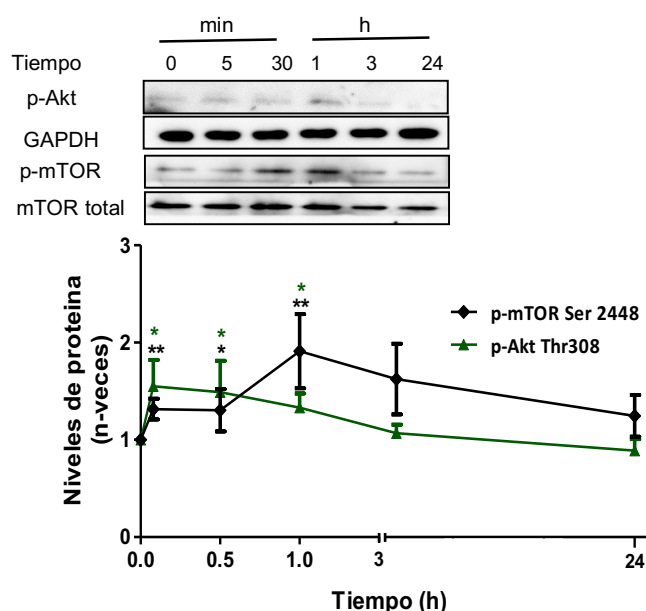


Figura 19. Los BCAA inducen activación de vía PI3K-Akt-mTORC1 de manera tiempo dependiente. Las células fueron estimuladas con 10 mM de BCAA para realizar la curva tiempo respuesta durante periodos de tiempo desde 0 a 24 horas y estudiar la fosforilación de mTORC1 y Akt mediante western blot. Los valores se expresaron como incremento vs Control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 6-8 experimentos independientes. *P<0.05; **P<0.01 vs Control.

IV. RESULTADOS

Bajo estas condiciones experimentales, los BCAA fueron capaces de inducir la fosforilación de mTORC1 en niveles similares a los producidos por LPS (utilizado como control positivo) (**Figura 20**).

Por otro lado, se conoce que la vía de señalización PI3K/Akt se encuentra *upstream* de la activación de mTORC1 [132,134]. Los BCAA promovieron la fosforilación de Akt de forma tiempo dependiente con la respuesta máxima a 1 hora (**Figuras 19 y 20**), de forma semejante a lo observado con el LPS (**Figura 20A**). El inhibidor selectivo de mTORC1 (rapamicina), suprimió la activación de Akt y mTORC1 en respuesta tanto a los BCAA como a LPS (**Figura 20A**). Por otro lado, el inhibidor específico de PI3K (wortmanina), fue capaz de disminuir la activación de mTORC1 inducida por BCAA (**Figura 20B**). Los resultados obtenidos podrían indicar que existe una regulación de activación cruzada entre ambas vías.

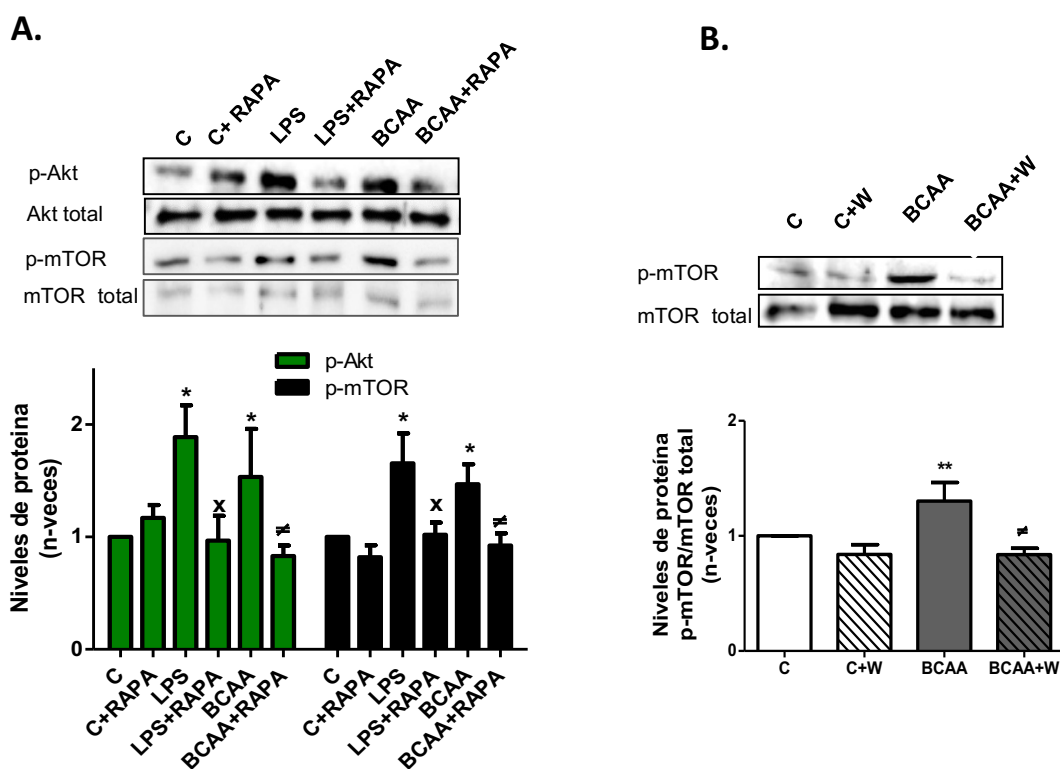


Figura 20. Regulación de activación cruzada entre PI3K/Akt y mTORC1 inducidas por los BCAA. Las células circulantes fueron pre-incubadas durante 30 min con el inhibidor de mTORC1 (100 nM, RAPA=rapamicina) (**A**) o el inhibidor de PI3K (1 μ M, W=wortmanina) (**B**) y estimuladas con BCAA (10 mM) o LPS (1 μ g/ml, control positivo) durante 1h para determinar la fosforilación de mTORC1 y Akt mediante western blot. Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 4-7 experimentos independientes. *P<0.05; **P<0.01 vs Control. [‡]P<0.05 vs BCAA; ^xP<0.05 vs LPS.

1.3. Los BCAA activan la vía de señalización de AMPK y su activador modula la activación de Akt y TORC1

AMPK es un sensor energético celular que juega un papel fundamental en la regulación de señales nutricionales [128]. Dado que los BCAA son nutrientes esenciales se propuso investigar

IV. RESULTADOS

qué concentraciones podrían ejercer un efecto sobre la vía de señalización de AMPK. Como se puede observar en la **Figura 21A**, altas concentraciones de BCAA (10 mM) activan la fosforilación de AMPK de forma tiempo dependiente y con máximo efecto a 1 hora. Además, la inducción causada por BCAA fue similar a la observada por el activador directo de esta vía, AICAR, utilizado como control positivo. Este efecto es independiente de la activación de mTORC1 dado que la rapamicina no produjo cambios en la fosforilación de AMPK en presencia de BCAA (**Figura 21B**). Sin embargo, cuando se estudió la fosforilación de Akt y mTORC1, en presencia del inductor de AMPK, se observó una disminución de la activación de estas vías (**Figura 21C**), lo que puede sugerir que AMPK se encuentra *upstream* y regula el eje PI3K/Akt-mTORC1 inducido por BCAA.

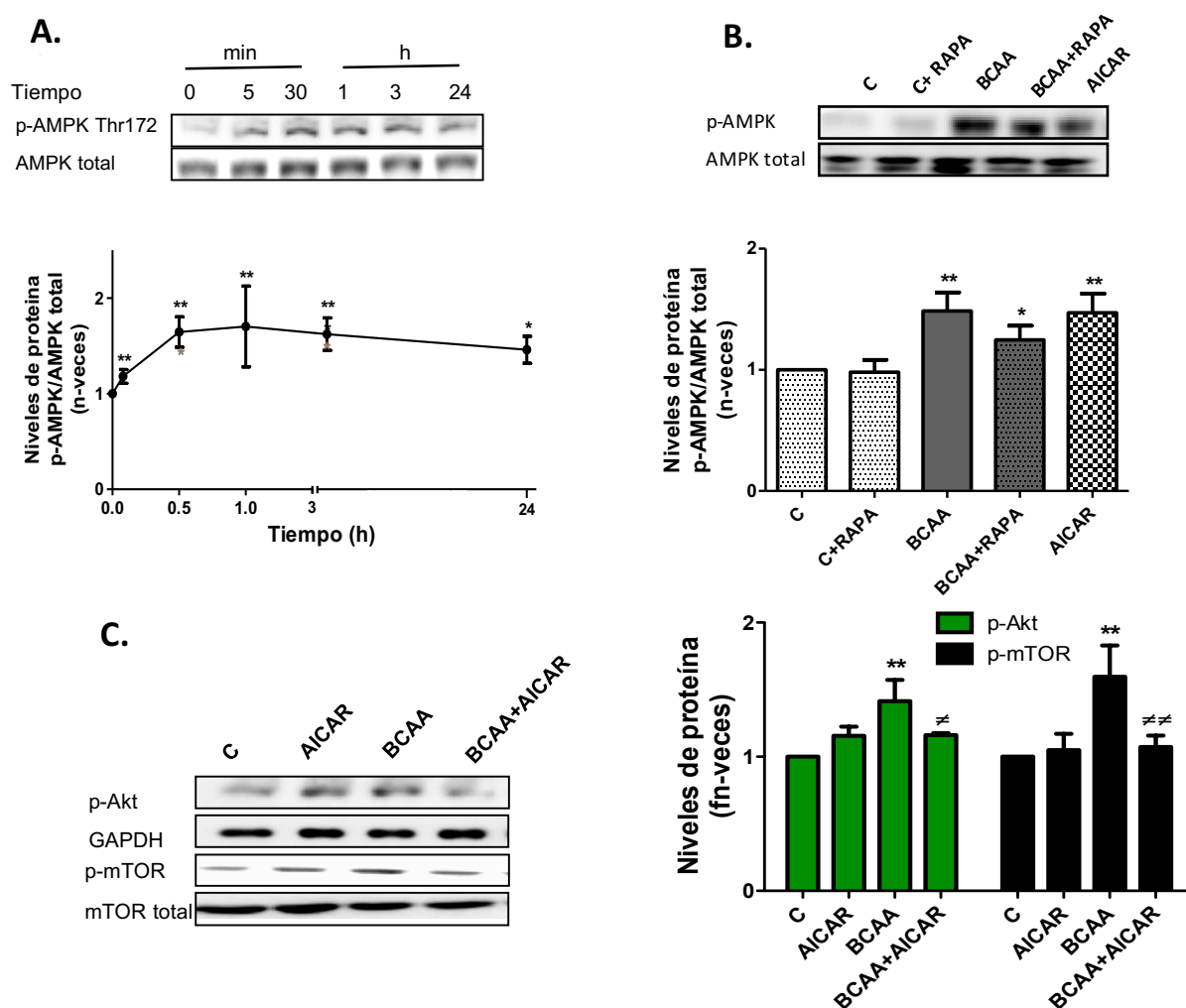


Figura 21. Activación de AMPK y su regulación de vías de señalización PI3K/Akt/mTORC1 inducidas por los BCAA. Las PBMC expuestas a 10 mM de BCAA para realizar la curva tiempo respuesta durante periodos de tiempo desde 0 a 24 h (**A**), pre-incubadas 30 min con el inhibidor de mTORC1 (100 nM, RAPA=rapamicina) y estimuladas con 10 mM BCAA, 1h (**B**) o pre-incubadas 30 min con el activador de AMPK (AICAR, 0.5 mM) y estimuladas con 10 mM BCAA, 1h (**C**) con el fin de estudiar la fosforilación de AMPK, Akt y mTORC1, respectivamente mediante western blot. Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 4-7 experimentos independientes. *P<0.05; **P<0.01 vs Control. #P<0.05; ##P<0.01 vs BCAA.

IV. RESULTADOS

1.4. Los BCAA inducen el estrés oxidativo mediante la vía mTORC1 y AMPK

Al observar que la estimulación de PBMC con los BCAA activaba el estrés oxidativo, se investigó si las vías de señalización como PI3K/Akt-mTOR y AMPK participaban en la producción de ROS. Como se puede observar en las **Figura 22A, 22B y 22C** los inhibidores específicos de la PI3K (wortmanina) y mTORC1 (rapamicina) y el activador de AMPK (AICAR) abolieron ambas fuentes de ROS inducidas por BCAA, sugiriendo la participación de esas vías en este proceso. Debido a que los BCAA fueron capaces de inducir la actividad de NADPH oxidasa, decidimos investigar qué subunidades catalíticas de la misma podrían participar. Tanto el inhibidor de la subunidad NOX-1 (ML171), como el de NOX-2 (gp91dstat), redujeron la actividad de NADPH oxidasa a los niveles controles (**Figura 22A**).

Con el fin de estudiar la participación de de otros inductores de la producción de ROS por BCAA se probaron varios tratamientos. Los resultados obtenidos mostraron que el inhibidor de NFκB (BAY-11-7082), así como el *scavenger* de ROS mitocondrial (mitotempo) inhibieron la producción de ROS (**Figura 22B**). Por otro lado, Nrf2 podría estar mediando las defensas antioxidantes ya que su agonista fue capaz de reducir la producción del estrés oxidativo por ambas fuentes inducidas por BCAA (**Figura 22A y 22B**).

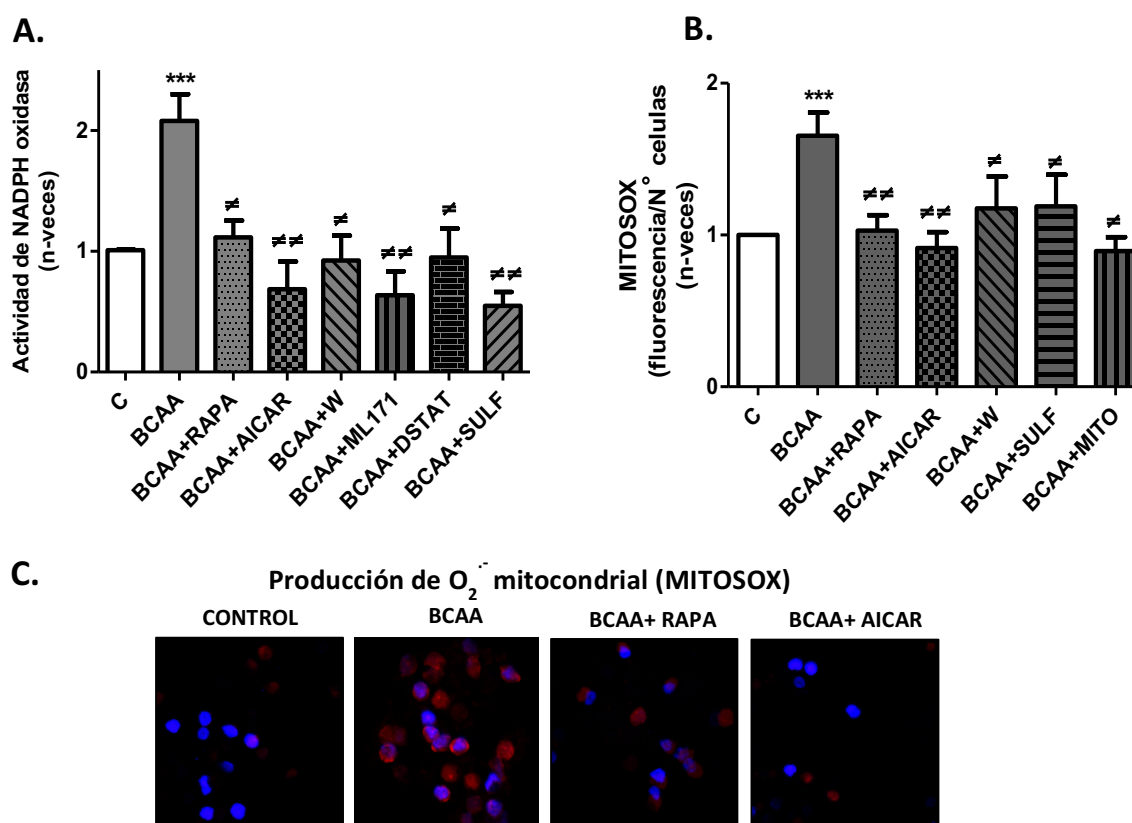


Figura 22. Los BCAA inducen la producción ROS via PI3K/Akt-mTORC1. Las PBMC fueron pre-incubadas 30 min con diferentes inhibidores: rapamicina (100nM), wortmanina (1 μ M), ML171 (0,5 μ M), gp91dstat (5 μ M), mitotempo (0,5 μ M) y sulforafano (20 μ M) o el activador de AMPK (AICAR 0,5 mM), y después estimuladas con BCAA (10 mM, 1h) con el fin de investigar la participación de distintas rutas de señalización en la inducción de **(A)** actividad NADPH oxidasa, la producción de anión superóxido mitocondrial medido por mitosox fluorescente **(B)** en un lector de placa o **(C)** microscopia confocal: z-stacks de imágenes de confocal mitosox (rojo) y núcleos (azul). Los valores se expresan como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 5-7 experimentos independientes. *P<0.05; ***P<0.0005 vs Control. \neq P<0.05 \neq P<0.005 vs BCAA.

1.5. Los BCAA pueden causar disfunción mitocondrial

La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS de la célula de mamíferos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. El exceso del estrés oxidativo puede dar lugar a un desequilibrio con la respuestas antioxidantes [107] que conduce a una agotamiento de la energía y finalmente a la muerte celular [109]. La medida de potencial de membrana mitocondrial utilizando el éster metílico de la tetrametil-rodamina (TMRM) como sonda fluorescente, podría proporcionar una valiosa información sobre el estado fisiológico de la célula y la función mitocondrial. Como muestran las **Figuras 23A y 23B**, los BCAA inducen de forma significativa la despolarización de la membrana mitocondrial tanto en poblaciones separadas de células (monocitos y linfocitos), como en la población total de PBMC. Este aumento en la despolarización fue disminuida en presencia tanto del inhibidor específico de mTORC1, como del inductor de AMPK (AICAR) sugiriendo la participación de ambas vías en este proceso.

Por otro lado, se considera que el desacoplamiento mitocondrial mediado por UCP-2 es uno de los importantes generadores de ROS mitocondriales [196]. Por ello, se quiso investigar cómo se comporta este enzima en respuesta a los BCAA. Curiosamente, se observó que la expresión proteica de UCP-2 en presencia de BCAA fue reducida a niveles prácticamente indetectables y que el tratamiento con rapamicina y AICAR los revierte al estado basal (**Figura 23C**). Estos resultados podrían indicar que los BCAA inhiben la activación de UCP-2 en respuesta al estrés oxidativo causado por los mismos y que tanto el inhibidor de mTORC1 como los inductores de AMPK revierten esa disminución.

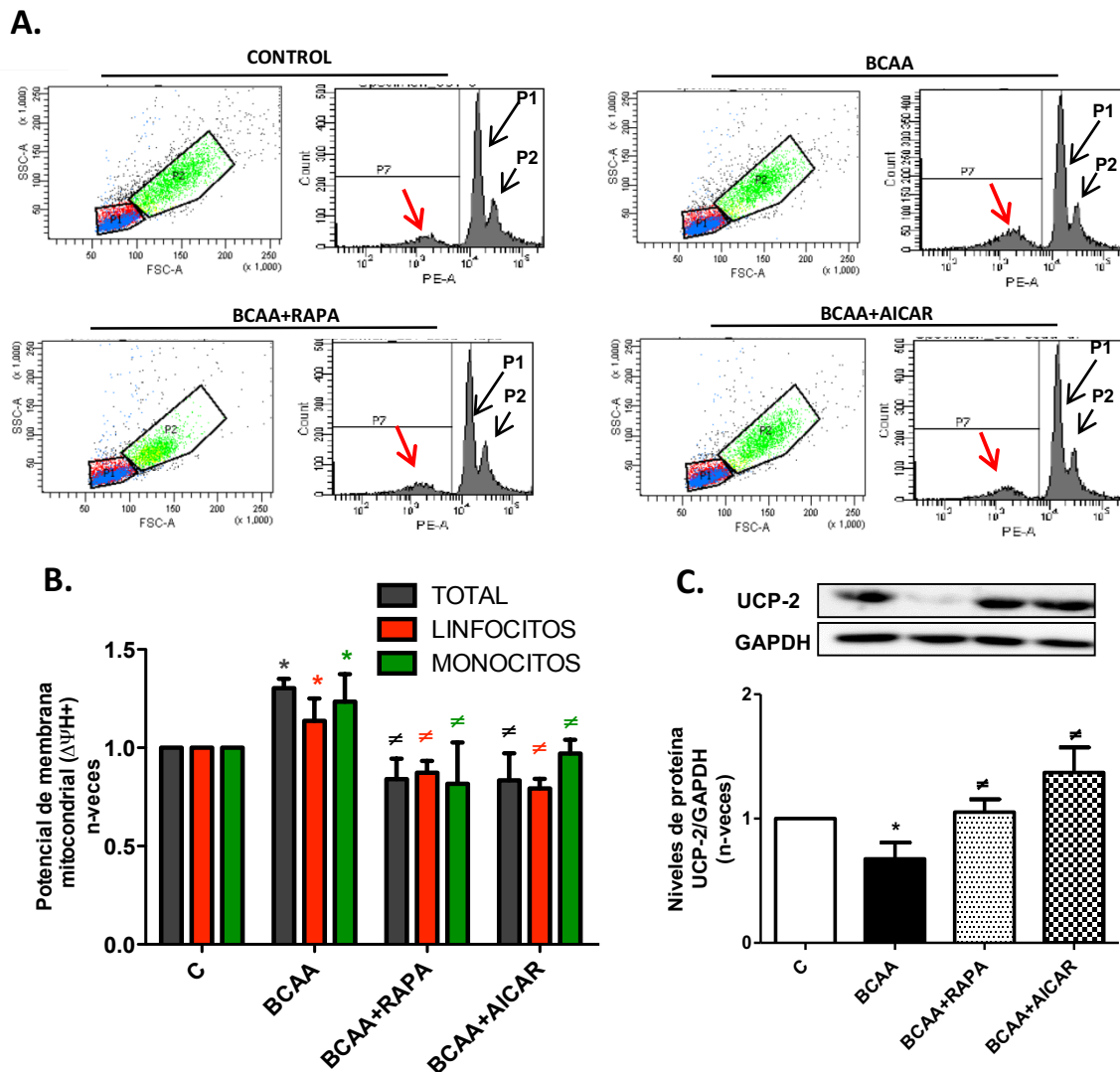


Figura 23. Los BCAA inducen despolarización de membrana mitocondrial. Las células estimuladas con BCAA (10 mM, 1h) previa incubación de 30 min con los inhibidores de mTORC1 e inductor de AMPK (rapamicina=RAPA y AICAR, respectivamente): **(A)** se muestran los histogramas y dot-plots representativos donde P1 son linfocitos, P2 son monocitos y P7 células muertas (flecha roja). **(B)** gráfico resumen de la cuantificación del potencial de membrana mitocondria. **(C)** Los niveles de expresión de proteína de UCP-2. Los valores se expresaran como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 5-6 experimentos independientes. * $P < 0.05$; vs Control. # $P < 0.05$ vs BCAA.

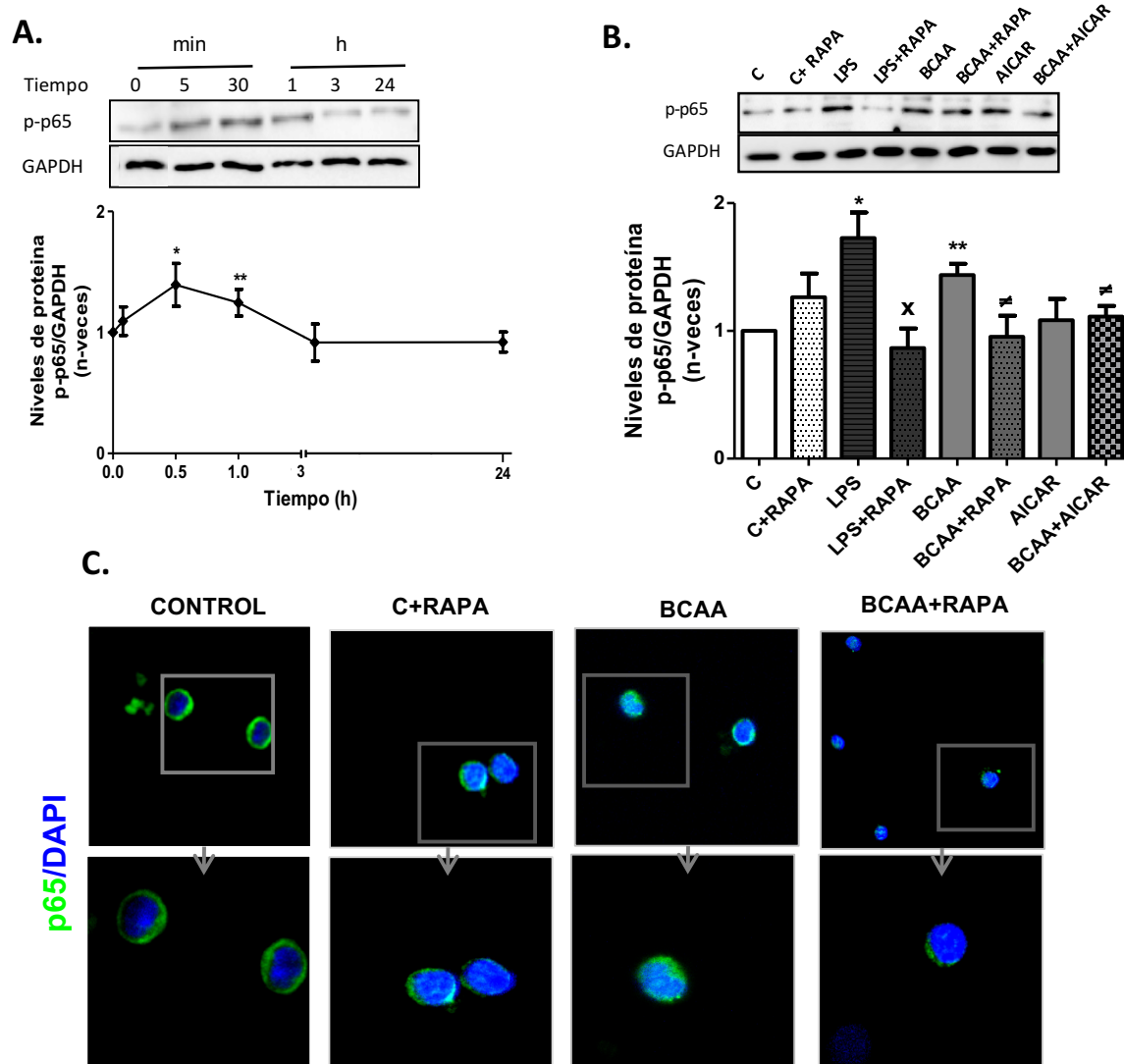
1.6. Los BCAA promueven la activación de NF- κ B y la expresión de los genes pro-inflamatorios

Existen datos previos que relacionan la activación de la vías pro-inflamatorias NF- κ B y el estrés oxidativo en diferentes condiciones clínicas [125,197]. La vía NF- κ B juega un papel clave en la activación y la funcionalidad de PBMC, por lo que se evaluó la fosforilación de la subunidad más importantes de su vía canónica (p65). Como se muestra en la **Figura 24A**, los BCAA activaron la fosforilación de p65 de forma tiempo dependiente con un máximo efecto a 30 minutos y manteniéndose a 1 hora. Además, los BCAA indujeron la fosforilación de p65 de manera similar a la producida por LPS (utilizado como control positivo). Esta activación fue dependiente de mTORC1 y AMPK, ya que tanto la rapamicina como los AICAR inhiben la inducción causada por

IV. RESULTADOS

BCAA (**Figura 24B**). Estos resultados fueron corroborados por técnicas complementarias como la translocación al núcleo del complejo activado de p65 por microscopia confocal (**Figura 24C**), así como la unión del factor de transcripción a su secuencia consenso (**figura 11D**). La fosforilación de p65, y sus consiguientes efectos nucleares, fueron revertidos en presencia de rapamicina y AICAR (**Figuras 24B, 24C y 24D**). Estos resultados confirman a los previamente obtenidos por western blot y sugieren que las vías de señalización de mTORC1 y AMPK son reguladores *upstream* de la activación de la vía canónica de NF- κ B.

Además, la fosforilación de p65 inducida por BCAA es dependiente del estrés oxidativo, ya que en presencia del *scavenger* de ROS mitocondrial (mitotempo), y el inhibidor inespecífico de NADPH oxidase (DPI), la producción de ROS disminuye (**Figura 24E**).



IV. RESULTADOS

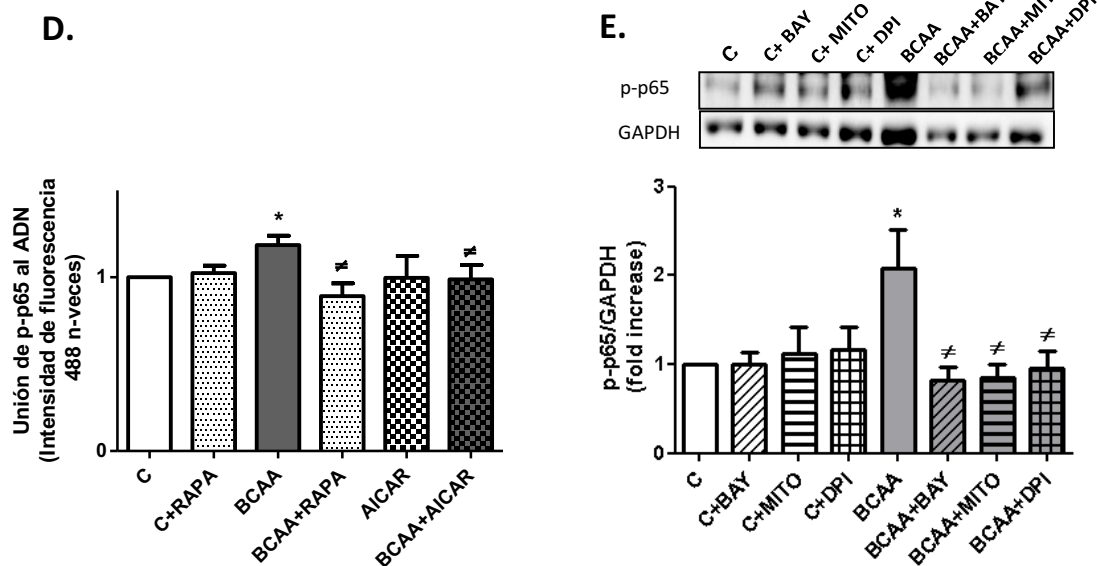
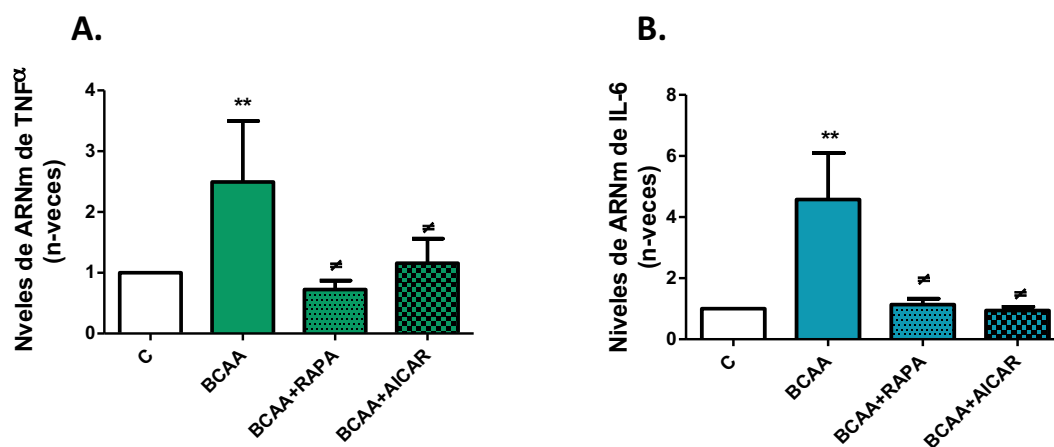


Figura 24. Los BCAA activan la vía canónica de NF- κ B en PBMC. Efectos de 10 mM BCAA sobre (A) la fosforilación de p65 a diferentes tiempos (B) la fosforilación de p65 a 1h previa incubación de 30 min con inhibidores: rapamicina (100 nM) y AICAR (0.5 mM) (E) BAY-11-7082 (1 mM), DPI (10 μ M) y mito-tempo (0.5 μ M) determinados por Western blot. (C) Imágenes de inmunocitofluorescencia que representan la localización nuclear de p65 (D) y la unión de p65 activado a su secuencia consenso en el núcleo. Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 4–7 experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control. $\neq P < 0.05$ vs BCAA $\times P < 0.05$ vs LPS utilizado como control positivo.

Los siguientes experimentos planteados fueron llevados a cabo para evaluar varios genes pro-inflamatorios dependientes de la vía NF- κ B como las citoquinas: IL-6 y TNF- α (Figuras 25A y 25B), así como los receptores de membrana CD40L e ICAM-1 (Figuras 25C y 25D) cuya activación facilita la adhesión y migración de leucocitos [61,198]. La expresión de los cuatro genes en respuesta a los BCAA fue bloqueada por rapamicina y AICAR sugiriendo la participación de vías mTORC1 y AMPK en este proceso (Figuras 35A-D).



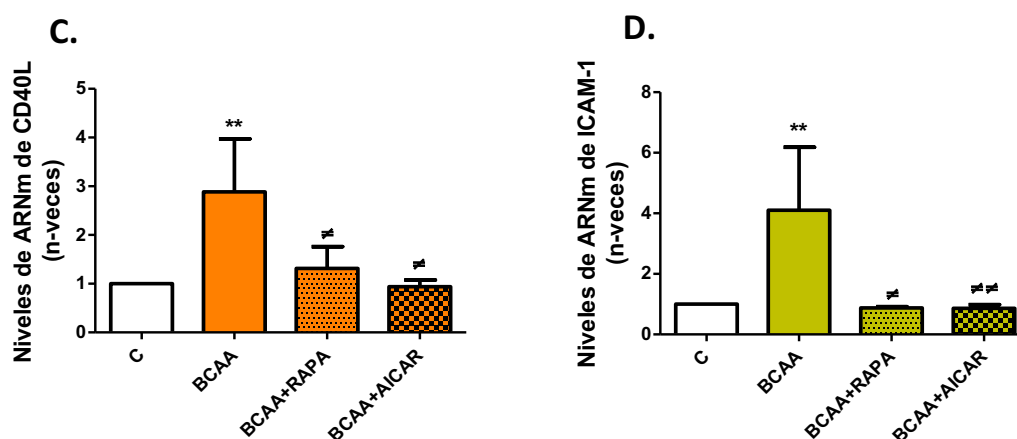


Figura 25. Los BCAA inducen genes pro-inflamatorios y de activación de linfocitos dependientes de NFκB. Efectos de los BCAA (10 mM) en presencia o ausencia de rapamicina o AICAR sobre los niveles de expresión génica en PBMC (A) IL-6 (B) TNFα (C) CD40L y (D) ICAM-1. Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media ± EEM de 5-7 experimentos independientes. *P<0.05, **P<0.01 or ***P<0.005 vs Control. #P<0.05 #*P<0.005 vs BCAA.

1.7. Los BCAA inducen la migración de células mononucleares circulantes

El siguiente propósito fue investigar las consecuencias funcionales de los efectos de BCAA en PBMC. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de migración celular por quimiotaxis. Las células fueron incubadas con BCAA a 10 mM y se dejaron migrar a través de un transwell durante 1 hora. Los resultados obtenidos mostraron que los BCAA fueron capaces de estimular la migración de PBMC de la misma manera a la inducida por el control positivo utilizado, LPS (Figura 26). El bloqueo del eje de señalización celular PI3K/Akt-mTORC1 por wortmanina o rapamicina, o la activación de vía AMPK por AICAR, revirtió la capacidad quimiotáctica inducida por los BCAA. Además, la inhibición de la inflamación derivada de la activación de NF-κB o de las dos fuentes de estrés oxidativo (actividad de NADPH oxidasa y la mitocondria) por BAY-11-7082, DPI y mitotempo, respectivamente, disminuyeron la migración celular inducida por BCAA (Figura 26). Estos resultados podrían indicar la participación del estado pro-inflamatorio y pro-oxidante generado en presencia de BCAA en la capacidad migratoria de PBMC.

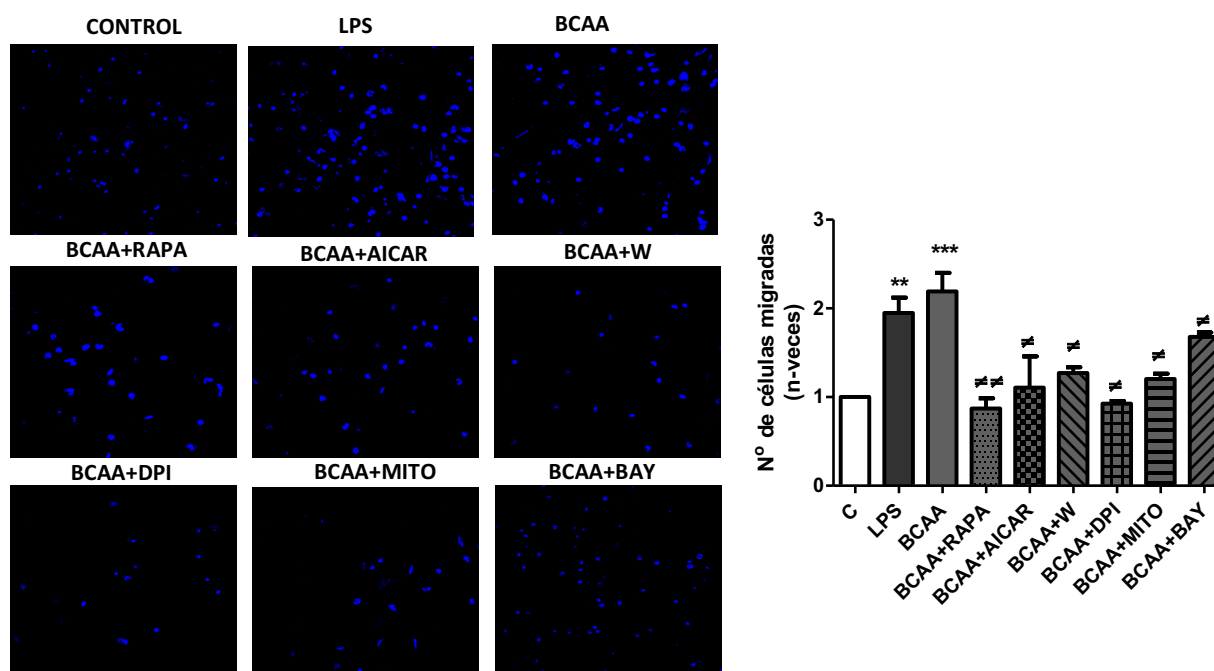


Figura 26. Los BCAA aumentan la capacidad migratoria de las PBMC. Las células se dejaron sin estimular (Control) o fueron estimuladas con LPS (control positivo) o los BCAA durante 1h en presencia o ausencia de rapamicina (RAPA), AICAR, wormanina (W), DPI, mitotempo (MITO) y BAY-11-7082 (BAY). Los efectos de los BCAA sobre la quimiotaxis de PBMC se determinó mediante la migración utilizando transwells. Los valores se expresan como el incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 5-7 experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.005$ vs Control. # $P < 0.05$ # $P < 0.005$ vs BCAA.

1.8. Los BCAA activan respuestas antioxidantes y antiinflamatorias mediadas por AMPK

Se ha demostrado recientemente en fibroblastos la existencia de una correlación de las vías de señalización de AMPK y el estado redox de las células mediado por Nrf2 (reguladores del balance energético y estado redox de la célula, respectivamente) [111]. En el presente trabajo, se investigó si los BCAA afectan a la fosforilación y a la localización nuclear de Nrf2 en PBMC. Como se puede observar en la **Figura 27**, los BCAA fueron capaces de aumentar la expresión proteica de Nrf2 a los niveles producidos por LPS (estímulo inflamatorio utilizado como control positivo). Los resultados obtenidos indican que los BCAA activan defensas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo y a la inflamación inducida por los mismos. Por otro lado, el AICAR (inductor directo de AMPK), activa Nrf2, corroborando la relación existente entre ambas vías. Estos resultados fueron confirmados por técnicas complementarias, observando directamente la translocación al núcleo del Nrf2 activado (**Figura 27C**) o la unión a su secuencia consenso (**Figura 27B**).

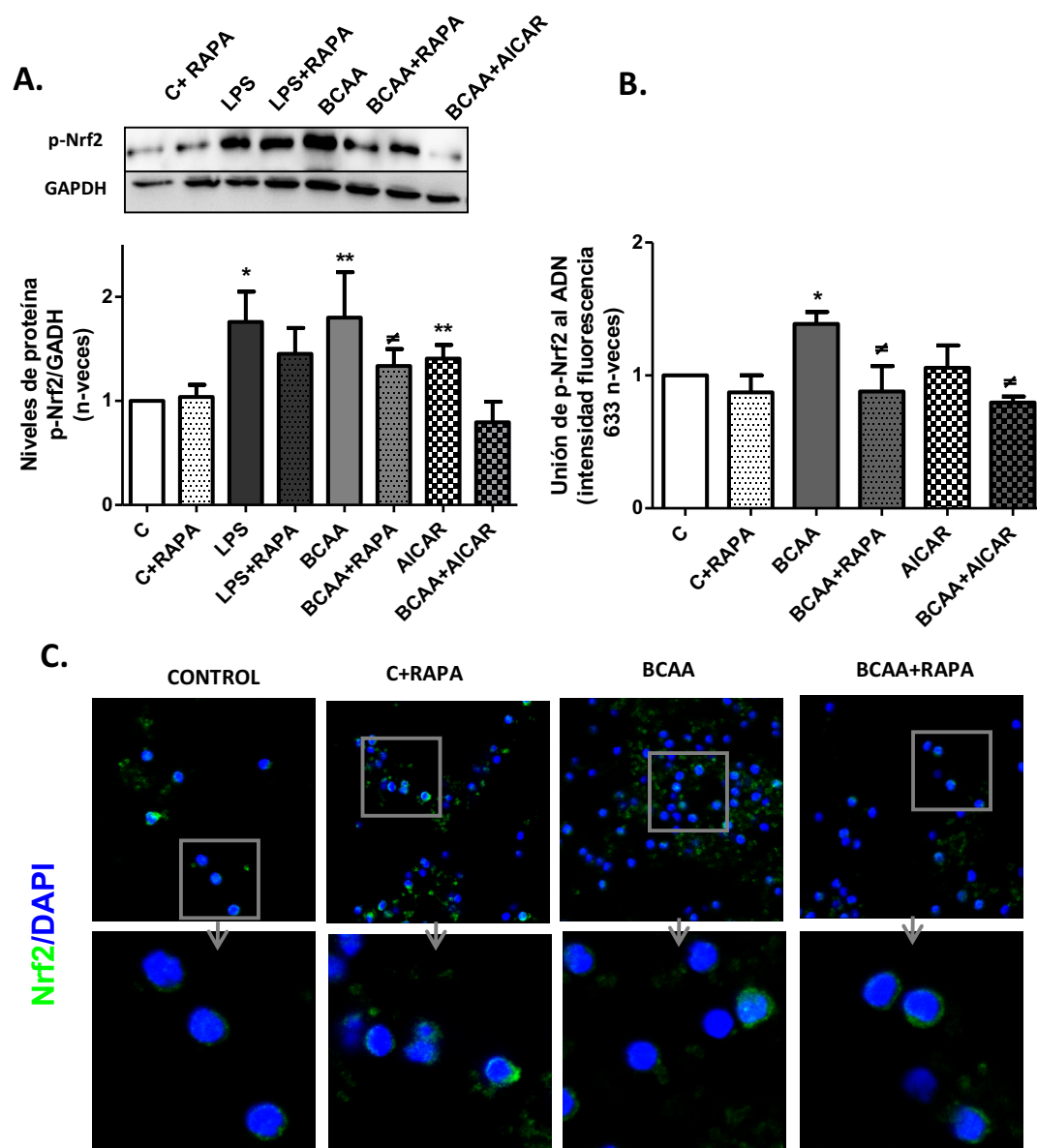


Figura 27. Los BCAA inducen la activación de Nrf2 de forma AMPK-dependiente. Efectos de los BCAA en presencia o ausencia de rapamicina y AICAR sobre **(A)** la expresión proteica de p-Nrf2, **(B)** la translocación nuclear de p65 detectado por inmunocitofluorescencia y **(C)** la unión de p65 activado a su secuencia consenso en el núcleo el cual se expresa como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 4–6 experimentos independientes * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control. # $P < 0.05$ vs BCAA $\times P < 0.05$ vs LPS.

PARTE 2: NIVELES ELEVADOS DE AMINOÁCIDOS ALIFÁTICOS DE CADENA RAMIFICADA PROMUEVEN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

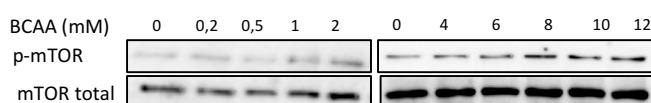
En esta capítulo de la tesis se pretende investigar los posibles efectos de altas concentraciones plasmáticas de los BCAA sobre el endotelio. Para ello, se llevaron acabo estudios de la función en las aortas de los ratones sanos y para investigar los mecanismos, las células endoteliales humanas aisladas de vena safena.

2.1. Los BCAA activan la vía de señalización mTORC1 y AMPK en CE de manera dosis dependiente

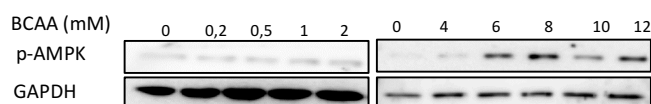
En parte anterior se describieron las vías de señalización a través de las cuales actúan los BCAA en PBMC que son mTORC1 y AMPK. Por ello, se exploraron las mismas vías en CE en cultivo *in vitro*. En primer lugar, se realizó una curva de concentración respuesta de BCAA sobre la fosforilación de ambas vías. El rango de concentraciones utilizado fue desde 0,2 hasta 12 mM. Como muestran los resultados representados en las **Figuras 28A y 28B**, los BCAA indujeron significativamente la fosforilación de mTORC1 y AMPK, con máximo efecto a concentración de 6 mM y 1 hora de estimulación.

Además, la inducción de AMPK causada por BCAA fue similar a la observado por el activador directo de esta vía, AICAR, (**Figura 28C**). Sin embargo, cuando se estudió la fosforilación mTORC1 y Akt, en presencia del inductor de AMPK y el inhibidor de mTORC1, se observó una disminución de la activación de esas vías a los niveles basales (**Figura 28D y 28E**), lo que puede sugerir que AMPK se encuentra *upstream* y existe una regulación cruzada entre las tres rutas de señalización.

A.



B.



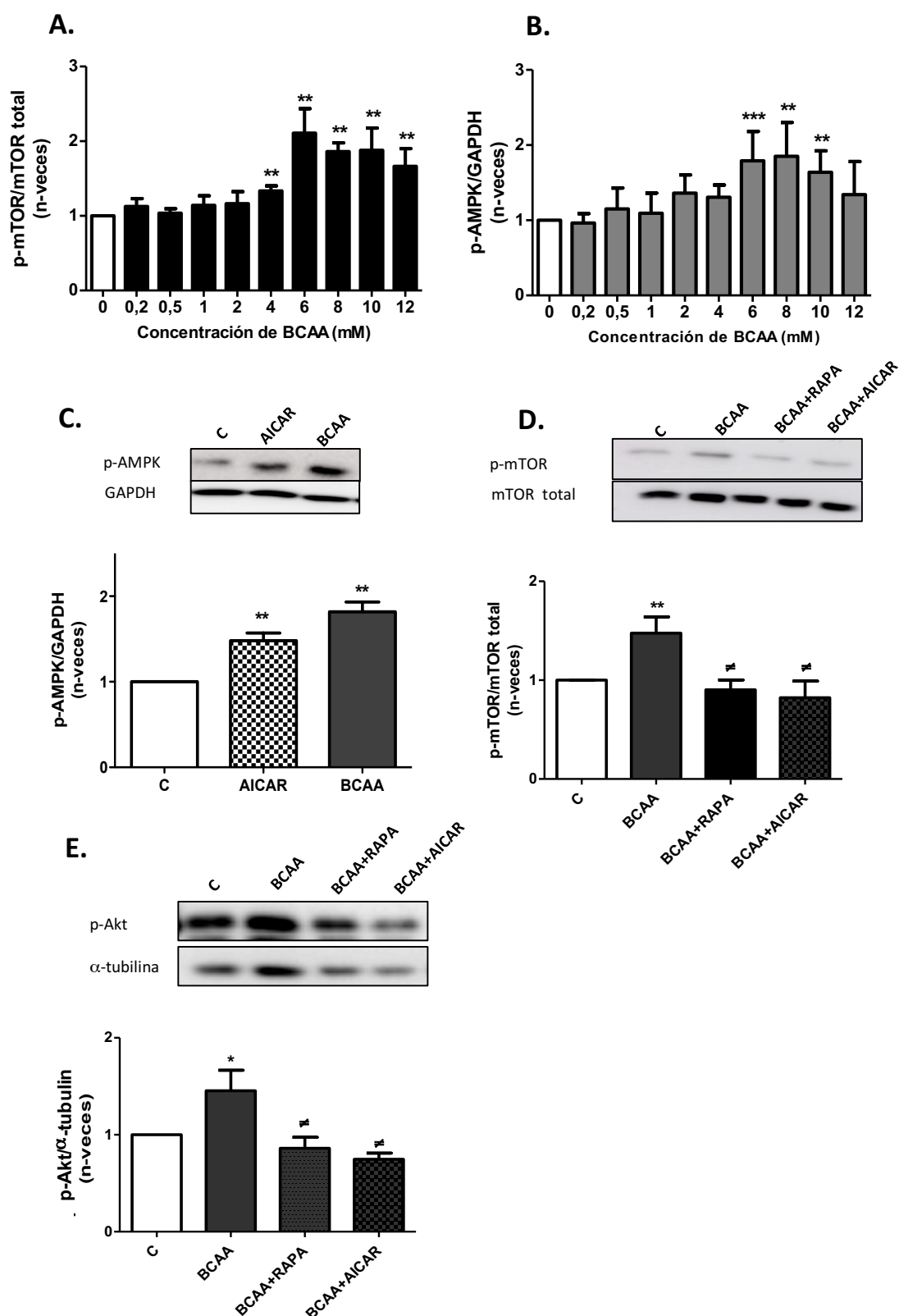
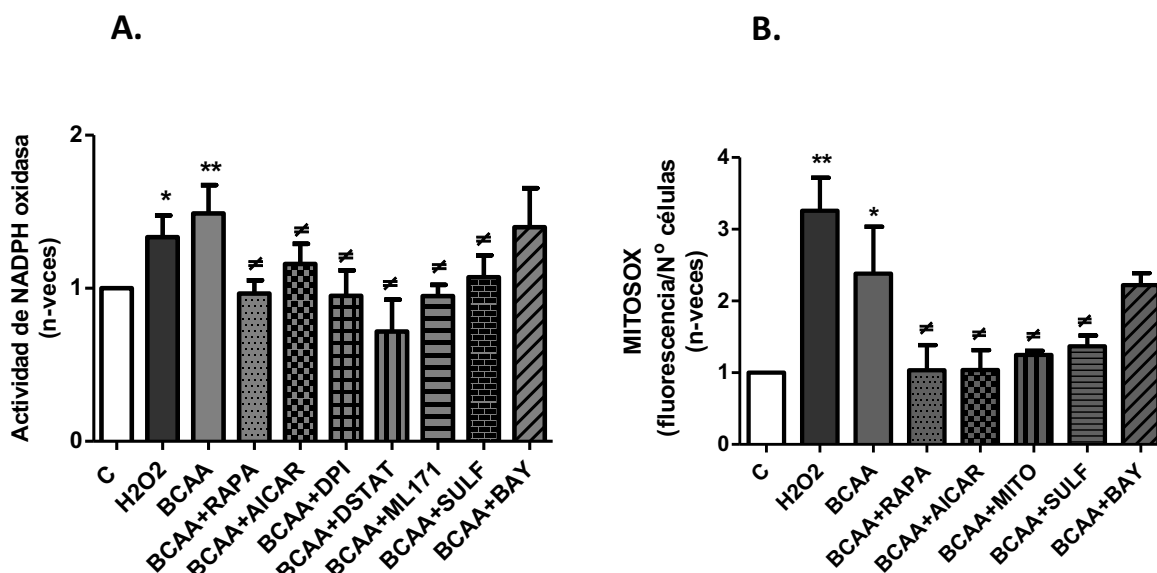


Figura 28. Los BCAA activan la fosforilación de la vía de señalización de mTORC1/Akt y AMPK en CE. Las células fueron expuestas con BCAA (0,2-12 mM) y estudiamos la expresión de **(A)** p-mTORC1 y **(B)** p-AMPK, **(C)** el efecto de los BCAA (6 mM, 1h) sobre p-AMPK; el efecto del activador de AMPK (AICAR) e inhibidor de mTORC1 sobre la fosforilación de p-mTOR **(D)** y p-Akt **(E)**. Los valores se expresan como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 6 experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs Control. $\#P < 0.05$ vs BCAA.

2.2. Los BCAA inducen el estrés oxidativo mediante la activación de las vías de señalización mTORC1 y AMPK

El siguiente objetivo fue investigar si los BCAA afectaban al estrés oxidativo en CE de similar forma a lo observado en PBMC. Para ellos, se estudiaron, la actividad NADPH oxidasa y la producción de ROS por la mitocondria. Como se puede observar en las **Figuras 29A, 29B y 29C** ambas fuentes de ROS fueron activadas en presencia de los BCAA (6 mM) y ésta activación fue abolida al utilizar tanto el inhibidor específico de mTORC1 (rapamicina) como el activador de AMPK (AICAR). Además, se comprobó la implicación de dos subunidades catalíticas de NADPH oxidasa, NOX-1 y NOX-2, ya la expresión génica de ambas estaba aumentada en CE en presencia de los BCAA (**Figuras 29D y 29E**). Asimismo, tanto el inhibidor de la subunidad NOX-1 (ML171), como el de NOX-2 (gp91dstat), redujo a niveles controles la actividad de NADPH oxidasa (**Figura 29A**).

Se exploró la participación otras vías en el aumento de ROS por los BCAA. Los resultados obtenidos mostraron que el antioxidante mitocondrial (mitotempo) inhibió la producción de ROS mitocondriales (**Figura 29B**), mientras que el inhibidor de la vía NF- κ B (BAY-11-7082) no afectó a ninguna de las dos fuentes (**Figuras 29A y 29B**). Por otro lado, Nrf2 podría inducir las defensas antioxidantes ya que su agonista disminuyó el estrés oxidativo inducido por los BCAA procedente de ambas fuentes (**Figuras 29A y 29B**).



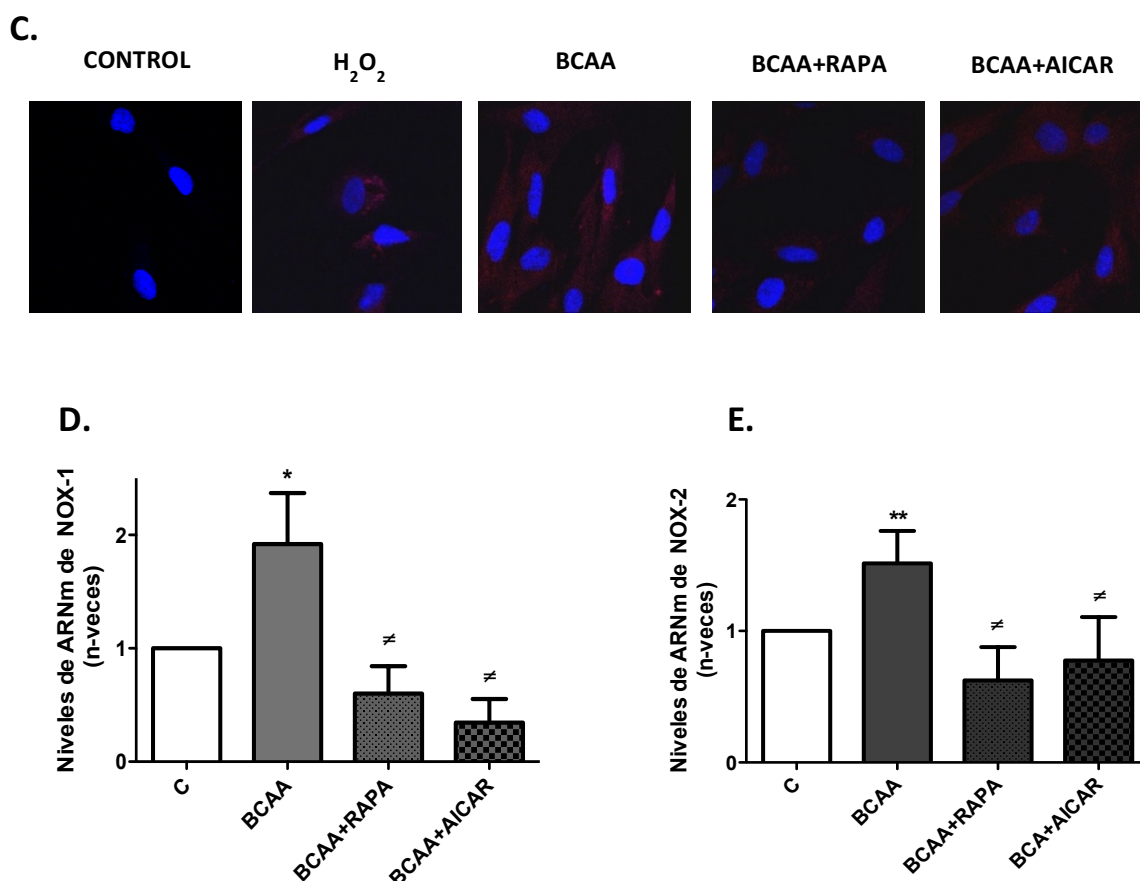


Figura 29. Los BCAA inducen la producción de ROS vía mTORC1. Las células fueron pre-incubadas con diferentes inhibidores como rapamicina (100 nM), AICAR (0,5 mM), DPI (10 μ M), ML171 (0,5 μ M), gp91dstat (5 μ M), mitotempo (0,5 μ M), BAY-11-7082 (1 mM) y sulforafano (20 μ M) durante 30 min para estudiar los efectos de BCAA (6 mM, 1h) sobre **(A)** la actividad NADPH oxidasa **(B)** O₂^{•-} mitocondrial determinado por fluorescencia en un lector de placa **(C)** Imágenes de microscopia confocal en las que se observa producción de O₂^{•-} por MitoSox (rojo) y núcleo (azul). **(D)** **(E)** Niveles de expresión de ARNm de NOX-1 y NOX-2. Los datos están expresados en Media \pm EES de 5-7 experimentos independientes. *P<0.05; **P<0.01 ***P<0.0005 vs Control. [‡]P<0. vs BCAA.

2.3. Los BCAA promueven la activación de NF- κ B y la expresión de los genes inflamatorios

Se conoce que la inflamación juega un papel importante en la disfunción endotelial [67,69]. Por ello, fue importante investigar los efectos que podrían tener BCAA sobre la ruta de NF- κ B en CE. Los BCAA aumentaron la fosforilación de p65 en CE, al igual que lo hacían en PBMC, y esta activación es dependiente de mTORC1 y AMPK (**Figura 30A**), ya que tanto la rapamicina como AICAR inhiben la inducción causada por BCAA. Estos resultados fueron confirmados por técnicas complementarias como la translocación al núcleo del complejo activado de p65 y la unión a su secuencia consenso (**Figura 30B**). Además, la producción de los ROS mitocondrial, pero no los procedentes de la actividad NADPH oxidasa, podría tener un papel importante en la activación de la activación de la vía canónica de NF- κ B, ya que el mitotempo inhibe la unión a p65 a su secuencia consenso (**Figura 30B**).

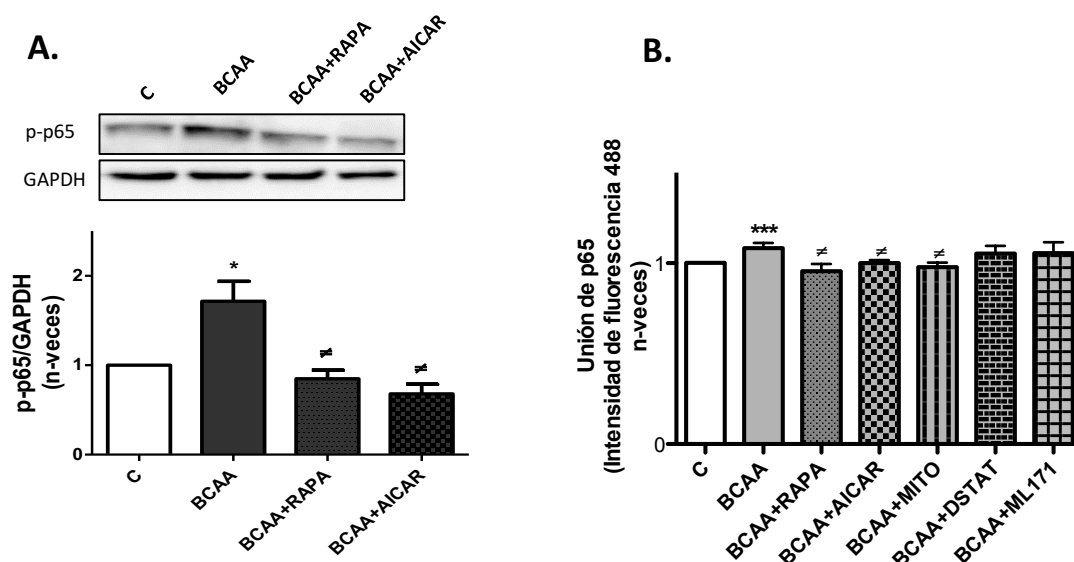


Figura 30. Los BCAA activan la vía canónica de NF- κ B vía mTORC1 y AMPK. (A) Los niveles de fosforilación de p65 y **(B)** resultados de ensayo de unión a la secuencia consenso de ADN. Los valores se expresaron como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 6 experimentos independientes. **P<0.01 vs Control. [#]P<0.05 vs BCAA.

Al estar activada la vía NF- κ B, el siguiente objetivo fue evaluar varios genes pro-inflamatorios dependientes de NF- κ B como son la E-selectina e ICAM-1 (**Figuras 31A y 31B**) cuya activación facilita la adhesión de diferentes células inflamatorias al endotelio [67,69,198]. La expresión de los dos genes en respuesta a los BCAA fue incrementada, pero tanto la rapamicina como AICAR bloquearon nuevamente esa respuesta (**Figuras 31A y 31B**). Estos resultados sugieren que las vías de señalización de mTORC1 y AMPK son reguladores *upstream* de la activación de la vía canónica de NF- κ B.

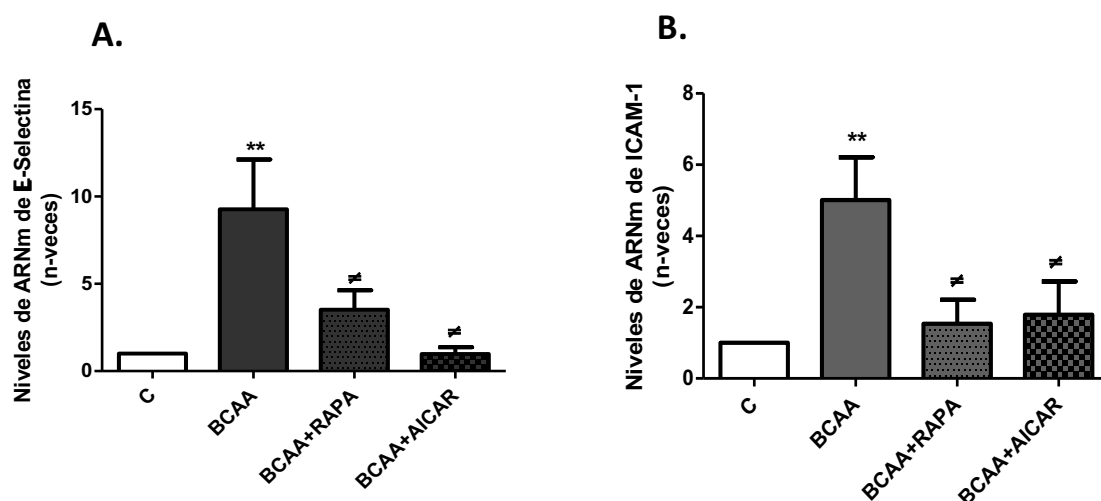


Figura 31. Los BCAA inducen genes pro-inflamatorias dependientes de NF- κ B via mTORC1 y AMPK. Los niveles de ARNm en CE. (A) E-selectina **(B)** ICAM-1. Los datos están expresados en Media \pm EES de 5–7 experimentos independientes. **P<0.01 vs Control. [#]P<0.05 vs BCAA.

2.4. Los BCAA inducen la adhesión de células mononucleares al endotelio

En la primera de esta tesis se demostró que la activación de ROS y la inflamación inducida por los BCAA aumentaba la capacidad migratoria de las PBMC. Por tanto, el siguiente paso fue investigar si las PBMC activadas se adherían a la monocapa de CE en presencia BCAA. Para lo cual, las células endoteliales fueron incubadas con BCAA a 6 mM durante 1 hora y después se pusieron en contacto con PBMC (marcadas previamente con Calcein-AM) durante 30 minutos. Los resultados mostraron que los BCAA aumentaron la adhesión endotelial de las PBMC (**Figura 32**). El bloqueo del eje de señalización celular PI3K/Akt-mTORC1 mediante wortmanina o rapamicina o por otro lado la activación de la vía AMPK por AICAR, revirtió la capacidad de unión al endotelio inducida por los BCAA. Además, la inhibición de ROS mitocondrial mediante mitotempo disminuyó la capacidad de adhesión de PBMC al endotelio. Sin embargo, la inflamación derivada de NF- κ B, la respuesta anti-oxidante e anti-inflamatoria de Nfr2 ni el estrés oxidativo inducido por la NADPH oxidasa no parecen afectar la actividad de adhesión celular (**Figura 32**) aunque existió cierta tendencia.

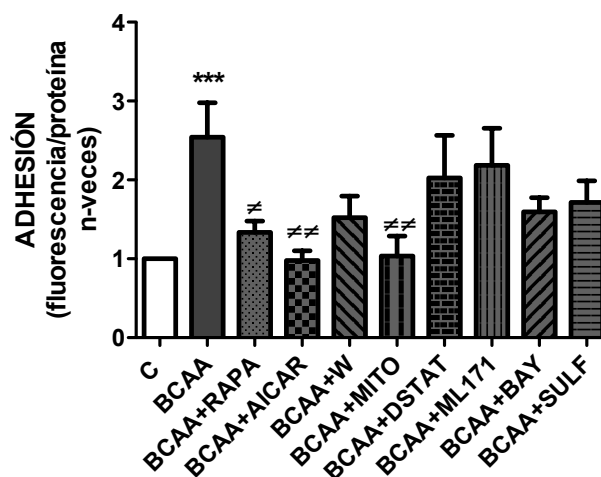


Figura 32. Los BCAA aumentan la capacidad adherente de CE. Células sin estimular (Control) o las los BCAA durante 1h en presencia o ausencia de rapamicina (RAPA), AICAR, wormanina (W), mitotempo (MITO), gp91dstat (DSTAT), ML171 y BAY-11-7082 (BAY). La adhesión de PBMC a la monocapa de CE se determinó por fluorescencia utilizando Calcein-AM. Los valores se expresaron como incremento del control y son media \pm EEM de 6-8 experimentos independientes. ** $P < 0.01$ vs Control. $\neq P < 0.05$ vs BCAA.

2.5. Los BCAA producen respuesta contráctil en la aorta de manera dosis dependiente

Posteriormente se examinaron, los posibles efectos funcionales de los BCAA sobre la aorta aislada de ratón. Para ello, se realizaron estudios de reactividad vascular *ex vivo* utilizando el método descrito por Mulvany y Halpern (1977) [191].

En primer lugar, se determinó la presencia de endotelio funcional por la capacidad de la acetilcolina (10 mM) de producir relajación en arterias previamente contraídas con fenilefrina hasta una contracción de aproximadamente el 50% de la inducida por K^+ -KHS. Se consideraron segmentos con endotelio funcional aquellos capaces de relajarse con acetilcolina más de un 70%

del tono previo.

Así, una vez comprobada la presencia de endotelio, se realizó una curva dosis respuesta a BCAA (0,2-10 mM, dosis aditivas) en segmentos aórticos en presencia o ausencia de fenilefrina (Phe, línea verde vs C, línea negra) a la concentración suficiente para alcanzar una contracción de aproximadamente el 50% de la contracción del K^+ -KHS.

Como se puede observar en la **Figura 33**, los BCAA fueron capaces por sí mismos de desencadenar una débil, pero significativa, respuesta contráctil de la aorta a concentraciones elevadas (8 mM). Por el contrario, cuando la arteria fue previamente contraída con fenilefrina, la contracción en respuesta a BCAA fue potenciada comenzando a dosis más bajas (2 mM).

Los resultados obtenidos sugieren que los BCAA, potencian su efecto vasoconstrictor en presencia de fenilefrina, ya que ésta activa la liberación del $[Ca^{2+}]_i$, imprescindible en la respuesta contráctil vascular [157,199].

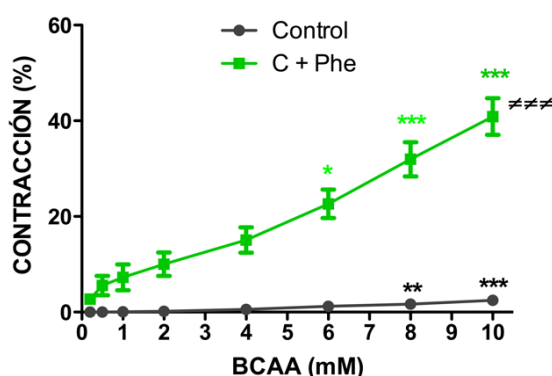


Figura 33. Curva dosis-respuesta a BCAA (0,2-10 mM) en segmentos de aorta de pre-contraídas o no con fenilefrina de ratones WT. Los resultados (media \pm EES) se expresan en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. Anova (dos-vías) *** $p < 0,001$ vs 0,2 mM. ## $p < 0,001$ vs aorta sin pre-contracción con fenilefrina. $n=8$ por cada grupo.

2.6. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante sobre la capacidad contráctil inducida por los BCAA

Es bien conocida, la relación existente entre el exceso de ROS procedente de la NADPH oxidasa o mitocondria y la activación del eje vascular ciclooxigenasa-2/unión de tromboxano A_2 a su receptor(COX-2/TP), que actúan disminuyendo la biodisponibilidad de NO en situaciones clínicas como la hipertensión, induciendo disfunción vascular y agravando la situación hipertensiva [146]. Por tanto, se investigó si los ROS podrían ser unos de los mecanismos a través de los cuales los BCAA inducirían contracción vascular. Para ello, los segmentos de la aorta fueron incubados durante 30 minutos (previos a realizar la curva dosis-respuesta a BCAA), con los inhibidores específicos de las subunidades del enzima NADPH oxidasa como ML171 (inhibidor de NOX-1) y gp91dstat (inhibidor de NOX-2), así como del *scavenger* de los ROS mitocondriales (mitotempo). Como muestran los resultados de la **Figura 34**, el estrés oxidativo mitocondrial,

pero no el procedente de la actividad de NADPH oxidasa, podría mediar la aumentada respuesta contráctil por BCAA en presencia de fenilefrina.

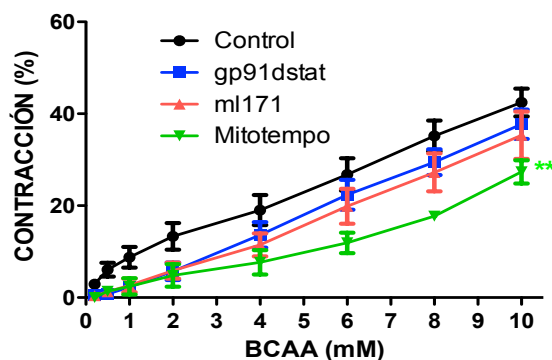


Figura 34. Curva dosis-respuesta a BCAA (0,2-10 mM) en segmentos de aorta de pre-contráctiles con fenilefrina de ratones WT. ML171 (inhibidor de NOX-1), gp91dstat (inhibidor de NOX-2) y mitotempo (*scavenger* de ROS mitocondriales) se añadieron al baño 30 min antes de realizar la curva concentración respuesta. Los resultados (Media \pm EES) se expresan en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. Anova (dos-vías) ** $p < 0,01$ vs curva de BCAA en aorta pre-contráctil con fenilefrina. $n=8-10$ por cada grupo.

2.7. La contracción de la aorta inducida por BCAA es endotelio dependiente

Está ampliamente descrito que el endotelio modula la respuesta a diferentes vasoconstrictores en distintos lechos vasculares. Además, la eliminación del endotelio potencia las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina o noradrenalina en la aorta [145,200]. Sin embargo, se desconoce el efecto que las altas concentraciones de BCAA pueden tener sobre el endotelio vascular. Por lo que, en este trabajo se planteó realizar una medida indirecta de la influencia de los BCAA sobre la disfunción endotelial. Distintos segmentos de la aorta fueron pre-incubados durante 30 minutos con el inhibidor de la NOS endotelial L-NAME y trascurrido ese tiempo realizamos la curva de dosis respuestas a los BCAA. La inhibición de la producción de NO, un vasodilatador endógeno del endotelio, potenció la respuesta contráctil producida por concentraciones crecientes de los BCAA (**Figura 35A y 35B**), sugiriendo que estos aminoácidos podrían actuar sobre el endotelio modulando su capacidad de relajación.

Con el fin de estudiar los posibles mecanismos por los cuales los BCAA causaban el efecto sobre el endotelio descrito arriba, se evaluó el papel del anión superóxido en la contracción inducida por los BCAA. Para ello, utilizamos un antioxidante específico de ROS de origen mitocondrial (mitotempo), así como catalasa e inhibidores selectivos de las subunidades del enzima NADPH oxidasa, gp91dstat (inhibidor de NOX-2) y ML171 (inhibidor de NOX-1). Todos los inhibidores revirtieron la aumentada capacidad contráctil de la aorta inducida por concentraciones crecientes de BCAA en presencia L-NAME. Estos resultados podrían indicar que los BCAA actuarían activando distintas fuentes de producción de ROS que, a su vez, podrían dañar el endotelio y así aumentar la contractibilidad arterial [146,157].

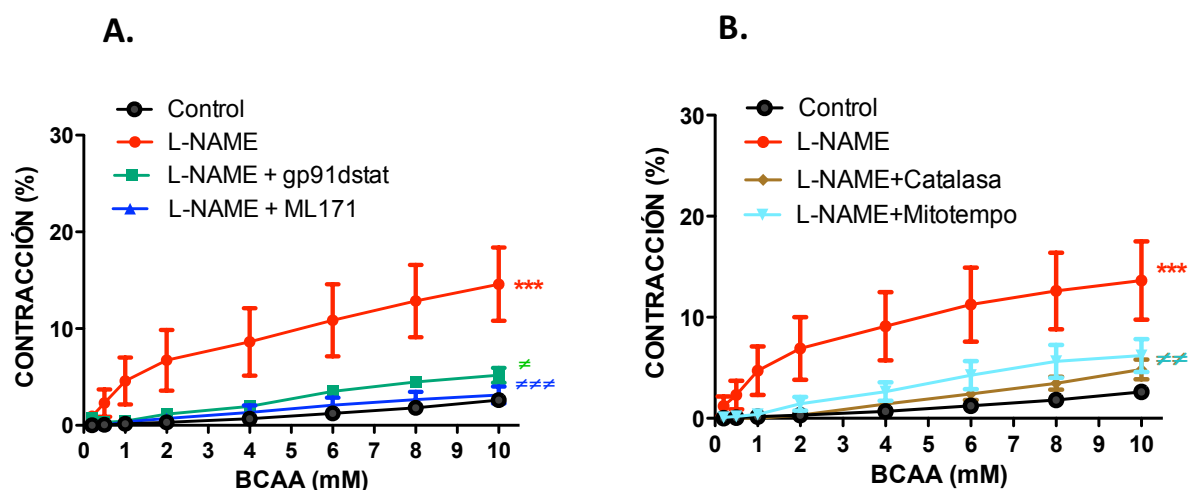


Figura 35. Efecto del L-NAME (100 µM) sobre la curva dosis-respuesta de BCAA (0,2-10 mM) en segmentos de aorta de ratones WT **(A)** ML171 (inhibidor de NOX1) y gp91dstat (inhibidor de NOX2) **(B)** mito-tempo (*scavenger* de ROS mitocondriales) y catalasa. Los inhibidores se añadieron al baño 30 min antes de pre-incubación con L-NAME que se añadió 30 min antes de realizar la curva dosis-respuesta a BCAA. Los resultados (Media ± EES) se expresan en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS. Anova (dos-vías) ***p< 0,001 vs curva de BCAA sin L-NAME; #p< 0,01 vs curva de BCAA con L-NAME; ##p< 0,001 vs curva de BCAA con L-NAME. n=8-10 por cada grupo.

El sistema de la NADPH oxidasa y la eNOS desacoplada (uNOS) son los sistemas productores de radicales superóxido más importantes en la célula endotelial. De hecho, estas moléculas son el indicador intracelular de una lesión extracelular [201]. Por ello, se examinó el estado de las NOS a nivel del endotelio. Como se puede observar en la **Figura 36A y 36B**, los BCAA aumentaron la expresión génica y proteica de la forma constitutiva de NOS endotelial (eNOS). Pero a pesar de estar más expresada, el daño endotelial causado por BCAA podría agotar los cofactores necesario para su correcto funcionamiento dando lugar a eNOS desacoplada, que en lugar de transferir electrones a la arginina actuaría rediciendo oxígeno molecular y generando superóxido. Por otro lado, la forma inducible de NOS, iNOS, también se incrementó en respuesta a los BCAA, produciendo NO en exceso (**Figura 36B**). El incremento citoplasmático de O₂^{•-} podría reaccionar con NO y lo transformarlo en peroxinitrito (OONO⁻), que formaría ácido peroxinitroso altamente dañino para los tejidos [201, 202].

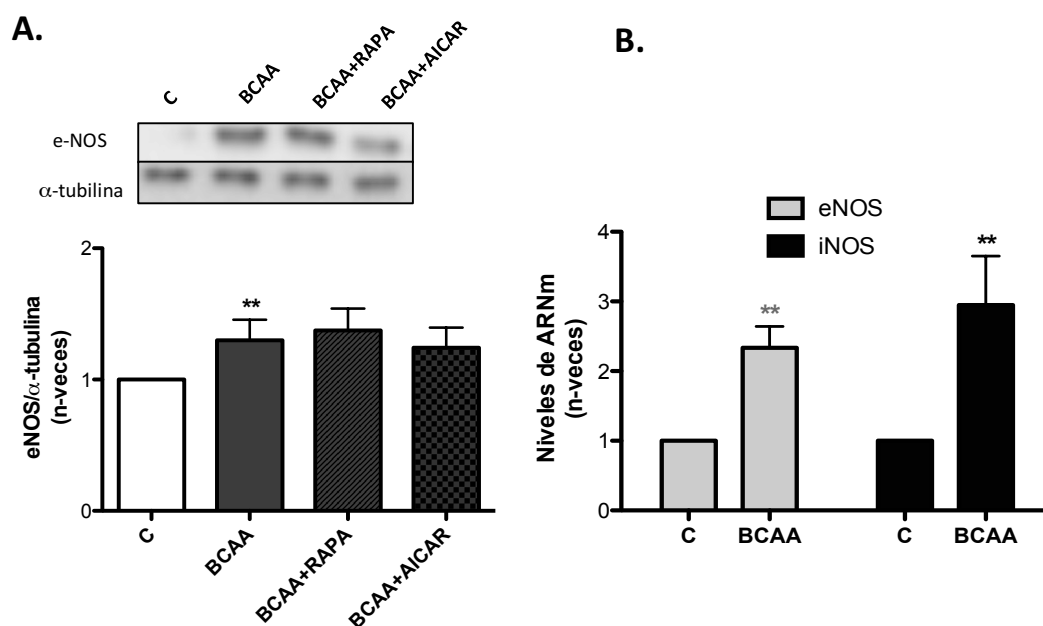


Figura 36. Los BCAA activan la expresión de iNOS y eNOS desacoplada. (A) Niveles de expresión de proteína de eNOS en CE expuestas a 6 mM de BCAA durante 1 h, previamente incubadas durante 30 min con rapamicina o AICAR. **(A)** Niveles de ARNm de eNOS e iNOS en CE expuestas a 6 mM de BCAA durante 1 h. Los valores se expresarán como incremento vs control (células no estimuladas); Media \pm EEM de 5-6 experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control.

2.8. Los BCAA causa disfunción endotelial prolongada en la aorta

Los BCAA añadidas de forma aguda fueron capaces de modificar la respuesta contráctil de la aorta de ratones WT. Por ello, se planteó estudiar los efectos de los mismos tras una incubación más prolongada a concentración única de los BCAA. Los anillos de aortas fueron expuestos durante 24 horas a 6 mM (la primera concentración que más contracción causa en incubaciones cortas; **Figura 33**), en medio RPMI-1640 a 37°C en una atmósfera húmeda compuesta por 95 % de aire y 5 % de CO₂.

Para evaluar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, se realizaron curvas dosis-respuesta de la ACh (desde 1 nM a 10 μ M) o independiente del endotelio DEA-NO (desde 1 nM a 10 μ M) añadida de manera acumulativa, en los segmentos contraídos previamente con fenilefrina (hasta el 50 % de la concentración obtenida con K⁺-KHS). Como se puede observar en la **Figura 37**, tras una exposición de 24h de los segmentos de aorta con 6 mM, la respuesta de relajación a acetilcolina dependiente del endotelio fue desplazada, mientras que la independiente del endotelio, curva de relajación a DEA-NO (**Figura 38**), se mantuvo intacta. Estos resultados confirman que los BCAA actúan sobre el endotelio causando disfunción, ya que en presencia de NO exógeno proporcionado por DEA-NO la capacidad de relajación de la aorta incubada con BCAA es similar a la de control.

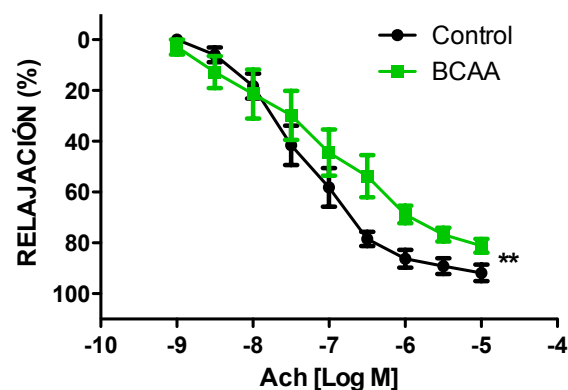


Figura 37. Curvas de relajación en respuesta a acetilcolina en segmentos de aorta pre-contráidos con fenilefrina de ratones WT no tratadas y tratadas BCAA (6 mM, 24 h). Los resultados (Media \pm EES) están expresados en porcentaje de la precontracción con fenilefrina. Anova (dos-vías) ** $p < 0,01$ vs no tratada con BCAA. $n=7$ por cada grupo.

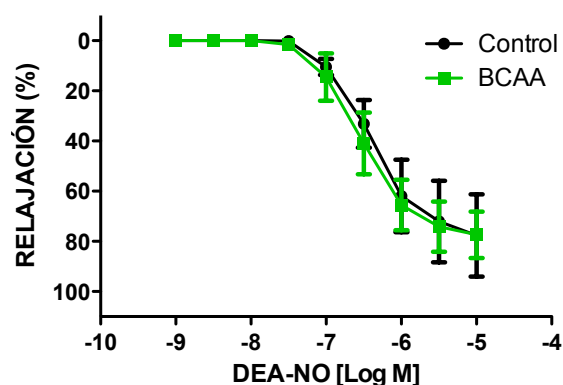


Figura 38. Curvas de relajación en respuesta a DEA-NO en segmentos de aorta pre-contráidos con fenilefrina de ratones WT no tratados y tratados BCAA (6 mM, 24 h). Los resultados (Media \pm EES) están expresados en porcentaje de la pre-contracción con fenilefrina. Anova (dos-vías) ** $p < 0,01$ vs no tratada con BCAA. $n=7$ por cada grupo

Por último, se realizaron curvas de dosis-respuesta contráctil con concentraciones crecientes de fenilefrina (desde 1 nM a 30 μ M) añadidas de manera acumulativa. Los resultados obtenidos mostraron que al incubar las aortas con BCAA 6 mM durante 24 horas, la respuesta vasoconstrictora aumentó de manera débil, pero significativa con respecto al control (en ausencia de BCAA) (**Figura 39**).

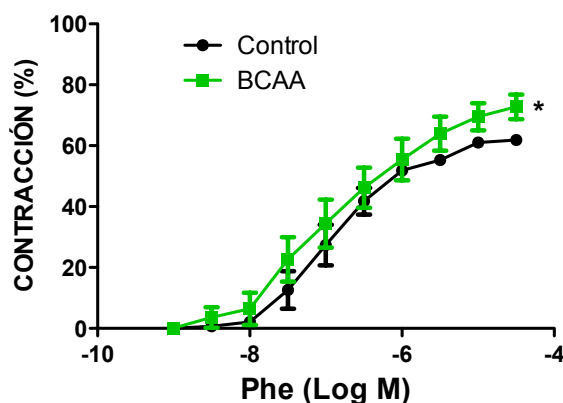


Figura 39. Efecto del BCAA sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de aorta de ratones WT no tratadas y tratadas BCAA (6 mM, 24 h). Los resultados (Media \pm EES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ KHS. Anova (dos-vías) * $p < 0,05$ vs no tratada con BCAA. $n=7$ por cada grupo.

IV. RESULTADOS

PARTE 3: ENSAYO CLÍNICO EXPLORATORIO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LOS SUPLEMENTOS DE LOS BCAA SOBRE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN INDIVIDUOS SANOS

A la vista de los datos obtenidos en los dos trabajos anteriores *in vitro* y *ex vivo* (véase parte 1 y 2), se procedió a varuar el impacto que podría tener en la salud la suplementación prolongada y dosis altas de BCAA, ya que son ampliamente utilizados con fines anabolicos entre los deportistas. Con este propósito, se realizó un ensayo clínico observacional en jóvenes sanos y un nivel de ejercicio físico moderado.

Los resultados presentados en la tesis son de los dos grupos participantes: grupo control (denominado como “C”) que no tomó ningún suplemento y grupo de tratamientoa (denominado como “BCAA”) a los que durante 7 días se les administró 6g/día de los BCAA.

3.1. Características de los participantes

Los dos grupos eran equiparables en número y en sexo. Todos cumplieron los criterios de inclusión de edad, IMC, medidas de presión sistólica, diastólica y pulsaciones dentro de los rangos de nomalidad y realizaron entre 4-6 horas de ejercicio moderado a la semana (**Tabla 6**).

Característica	C	C	BCAA	BCAA
Sexo	M	F	M	F
Edad, años	23,2±1	25,6±2	31±2	27±2
Altura, m	74,5±6	61,1±5	80,5±8	60,65±5
Peso, kg	1,75±0,04	1,67±0,03	1,78±0,04	1,65±0,02
IMC kg/m ²	24,05±2	21,6±1	25±2	22,5±1
PS, mmHg	119,2±4	104,4±3	117,8±2	103,6±4
PD, mmHg	75,4±4	75,8±3	76,4±4	76,4±2
Pulsaciones	68,4±4	70,2±6	69±3	84±2
Actividad física, h/semana	6±2	4±2	6±2	4±1

Tabla 6. Los datos están expresados en Media ± SEM; IMC=índice de masa corporal, PS=presión sistólica, PD=presión diastólica, M=masculino, F=femenino. n=10 por grupo.

Los BCAA son aminoácidos esenciales y se aportan a nuestro organismo por una dieta diaria equilibrada. Ciertos alimentos contienen los BCAA en cantidades elevadas (**tabla 1**) y podría influir en el aumento de estos aminoácidos en sangre. Por ello, los participantes hicieron un registro escrito de los alimento y las cantidades consumidos durante la semana del ensayo. Los datos del registro de los alimentos están expresadas en media de raciones /7 días (cada ración equivale a gramos de cada alimentos) (**Tabla 7**). Los alimentos ricos en BCAA consumidos por los participantes durante la semana del ensayo no afectaron al aumento de las concentraciones

IV. RESULTADOS

causada por la suplementación con BCAA comercial ni tampoco se han visto diferencias destacables entre los grupos ni sexos.

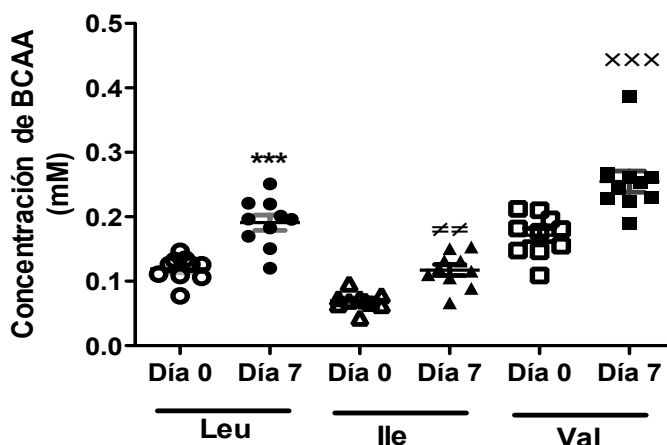
Alimentos	C	BCAA
Carne roja (~150 g)	1,2	1,45
Carne de ave (~200 g)	2,3	3
Embutidos y salchichas (<100g)	2,3	1,91
Frutos secos (~50 g)	0,9	0,91
Pescado blanco (~150 g)	1,2	0,55
Pescado azul (~150 g)	0,9	1,55
Huevos (~ 50g/huevo)	1,05	1,27

Tabla 7. Resumen de alimentos ricos en BCAA consumidos por los participantes. Los datos están expresados en media de la raciones; n=10 por grupo.

3.2. La suplementación diaria con BCAA incrementa los niveles séricos de BCAA

En primer lugar se determinaron los niveles de los BCAA alcanzados en suero en sujetos sanos con un metabolismo normal y que además practicaban deporte de forma moderada. Los resultados mostraron un aumento significativo de las concentraciones séricas de los tres aminoácidos, tanto por separado como en su conjunto, después de 7 días de ingesta de 6 g/día de los BCAA (**Figura 40 y tabla 8**). La leucina incrementó de 0,11 mM a 0,19 mM, la isoleucina de 0,06 mM a 0,11 mM y la valina 0,17 mM a 0,25 mM, lo que supuso un aumento del 17,3 %, 18,3 % y 12,9 %, respectivamente. Además, las concentraciones séricas alcanzadas son equiparables a las encontradas en pacientes diabéticos u obesos [24,42–44]

A.



B.

	Día 0 Media±EEM	Día 7 Media±EEM	Día 0 Media (rango)	Día 7 Media (rango)	P valor	
Leu	0,11±0,004	0,19±0,01	0,11 (0,07-0,146)	0,19 (0,12-0,25)	0,0003	***
Ile	0,06±0,004	0,11±0,007	0,06 (0,04-0,078)	0,11 (0,06-0,15)	0,0013	##
Val	0,17±0,009	0,25±0,014	0,17 (0,10-0,21)	0,25 (0,18-0,38)	P<0.0001	xxx
BCAA	0,36±0,017	0,56±0,03	0,36 (0,22-0,45)	0,56 (0,37-0,79)	0,0001	###

Figura 40. Las concentraciones de BCAA alcanzadas en suero tras 7 días de suplementación. (A) Gráfica representativa de los valores y **(B) la tabla 8** de concentraciones y el rango de valores mínimos y máximos alcanzados expresados como media \pm EEM. **Leu**=leucina, **Ile**=isoleucina y **Val**=valina. **C**=grupo control día 0 y día 7, **BCAA**= grupo de tratamiento con día 0 (toma de muestras antes de empezar el tratamiento) y día 7. ***P<0,05 vs Leu día 0; ##P< 0,005 vs Ile día 0; xxxP< 0,001 vs Val día 0; ###P< 0,001 vs Val día 0. n=10 por grupo.

3.3. La suplementación con BCAA durante 7 día activa respuestas pro-inflamatorias en sujetos sanos

Para analizar si los suplementos comerciales de los BCAA podrían tener algún efecto sobre la inflamación, tal como se observó en los estudios *in vitro* en PBMC y CE (parte 1 y parte 2), exploramos la vía canónica del NF κ B. Las PBMC fueron aisladas de la sangre de los participantes y se determinó la fosforilación de p65 mediante western blot. Como se puede observar en la **Figura 41**, el consumo de los BCAA durante una semana aumentó significativamente la fosforilación de p65 en comparación a su estado basal (BCAA día 0) o a los controles que no tomaron nada durante la semana de participación en el ensayo (C día 0 y día 7).

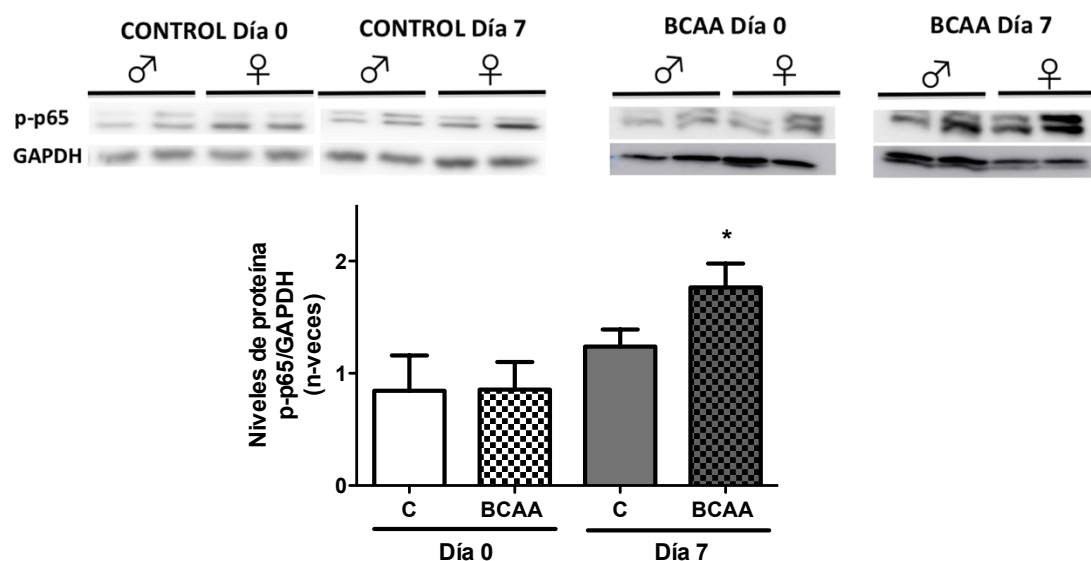


Figura 41. La suplementación con BCAA induce fosforilación de p65. La expresión proteica de p-p65 y GAPDH utilizado como control de carga. C=grupo control día 0 y día 7, BCAA=grupo de tratamiento con día 0 (toma de muestras antes de empezar el tratamiento) y día 7. Los datos expresados como media \pm SEM. * $P<0.05$; vs BCAA día 0. $n=8-10$ por cada grupo.

Al observarse la activación de la vía NF κ B, se determinaron también los niveles de los genes pro-inflamatorios dependientes de misma. Para ellos, se examinó la expresión del ARNm de IL-6, TNF- α y los genes responsables de la activación y la migración de los PBMC, como CD40L e ICAM-1. La administración de los BCAA durante 7 días aumentó significativo de los niveles del ARNm de los genes derivados de NF κ B como IL-6 (**Figura 42A**) y de CD40L (**Figura 42E**) e ICAM-1 (**Figura 42F**), sin modificar la expresión de TNF- α (**Figura 42B**). A pesar del incremento de los niveles de ARNm no se observó una mayor concentración de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α aunque hay cierta tendencia en el grupo tratamiento con BCAA (**Figuras 42C y 42D**).

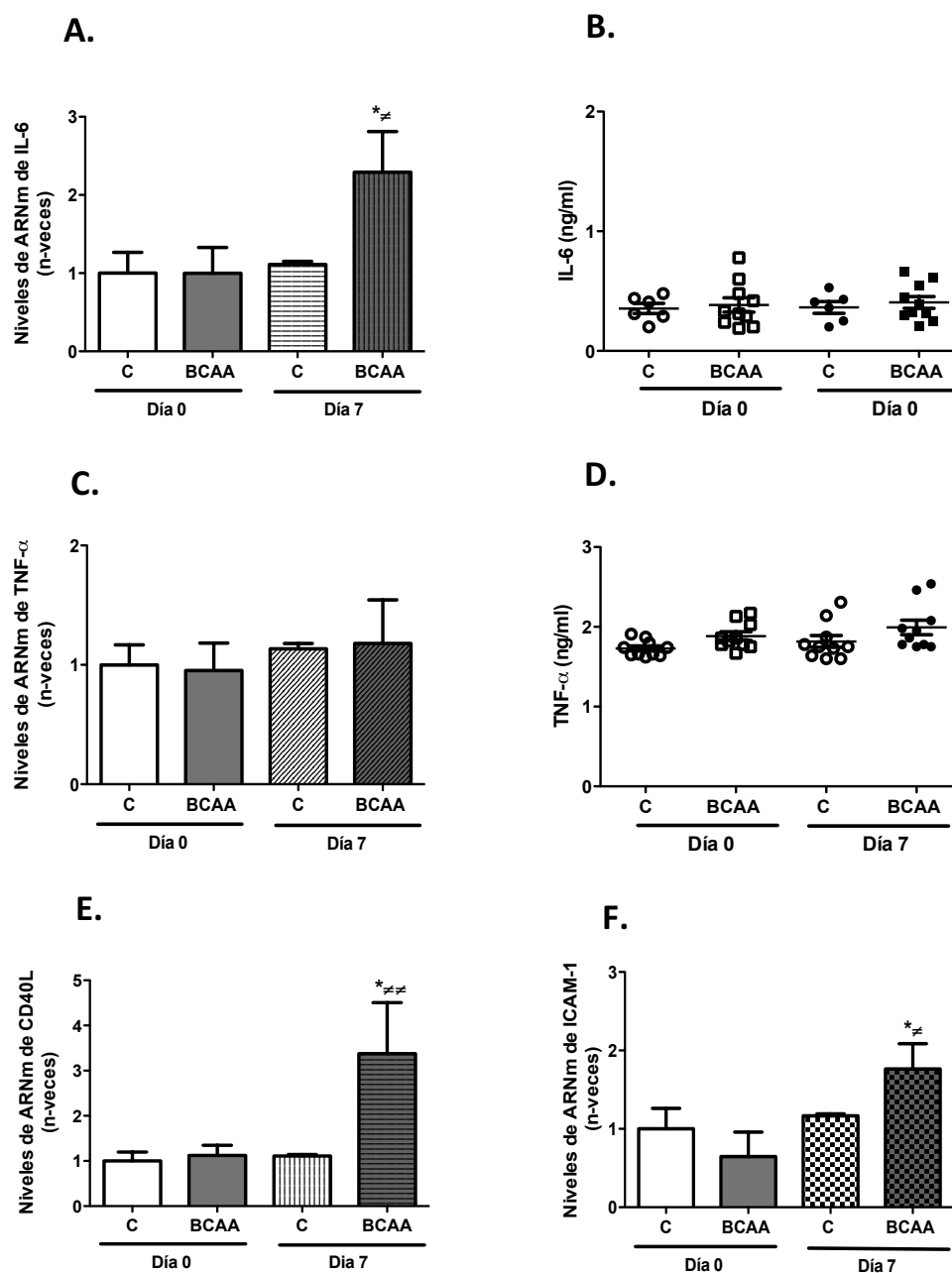


Figura 42. La suplementación con BCAA activa la expresión de genes pro-inflamatorios dependientes de la vía NFκB y aumento de los niveles de citoquinas en suero. Niveles de ARNm de IL-6 (A) TNF-α (C) CD40L (E) e ICAM-1(F). Concentración en suero de IL-6 (B) y TNF-α (D). C=grupo control día 0 y día 7, BCAA=grupo que tomaron BCAA día 0 y día 7. Los datos expresados como media ± EEM. *P<0.05; vs BCAA día 0; ‡ P<0.05; † P<0.01 vs C día 7. n=9-10 por cada grupo.

3.4. El consumo diario de BCAA durante 7 días activa estrés oxidativo en sujetos sanos

El siguiente propósito fue investigar el efecto de la ingesta del suplemento de los BCAA sobre la generación de estrés oxidativo en PBMC de los participantes. Para ello, determinamos las fuentes de producción de anión superóxido como la mitocondria, la actividad NADPH oxidasa y la producción del $O_2^{\cdot-}$ determinado por HPLC. Como se muestra en las Figuras 43A, 43B y 43C, el consumo de BCAA durante 7 días fue capaz de activar todas las fuentes de producción de ROS estudiadas en comparación al día 0 de los mismos participantes o el grupo control que no tomó nada durante la semana del ensayo.

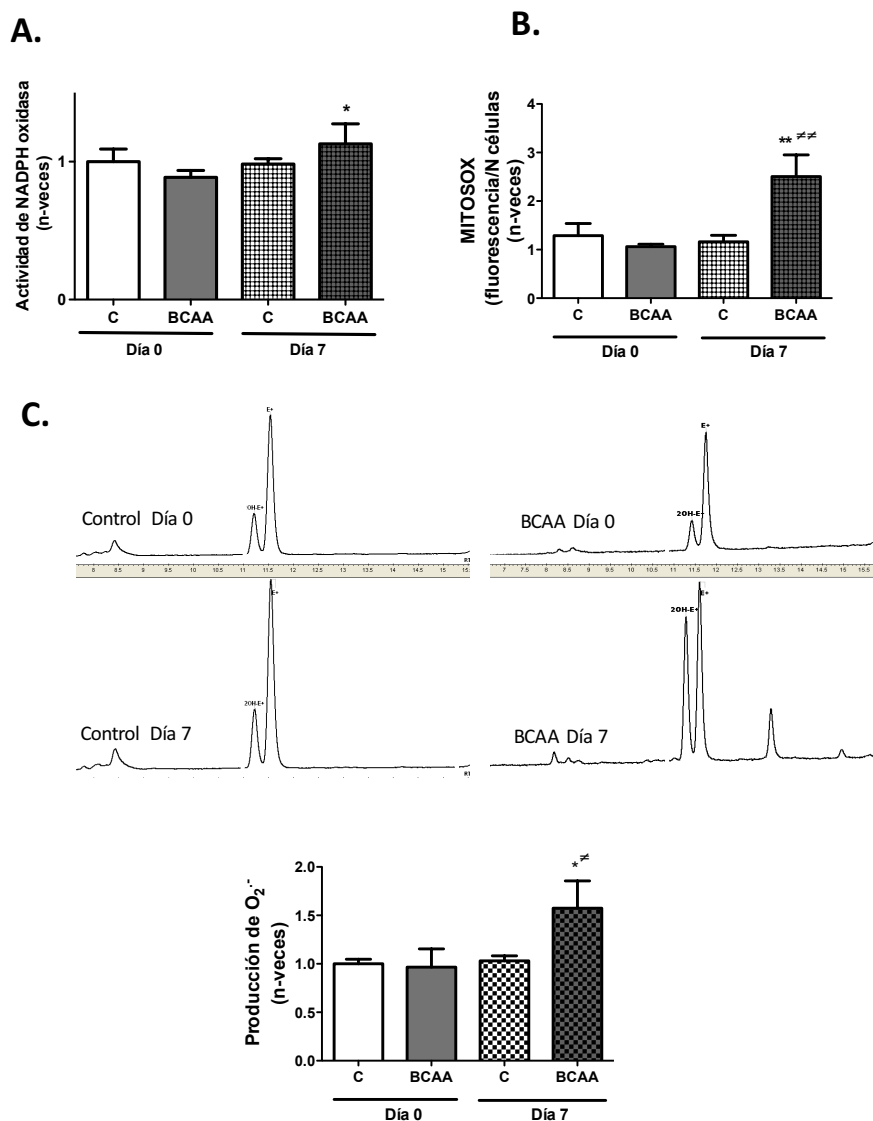
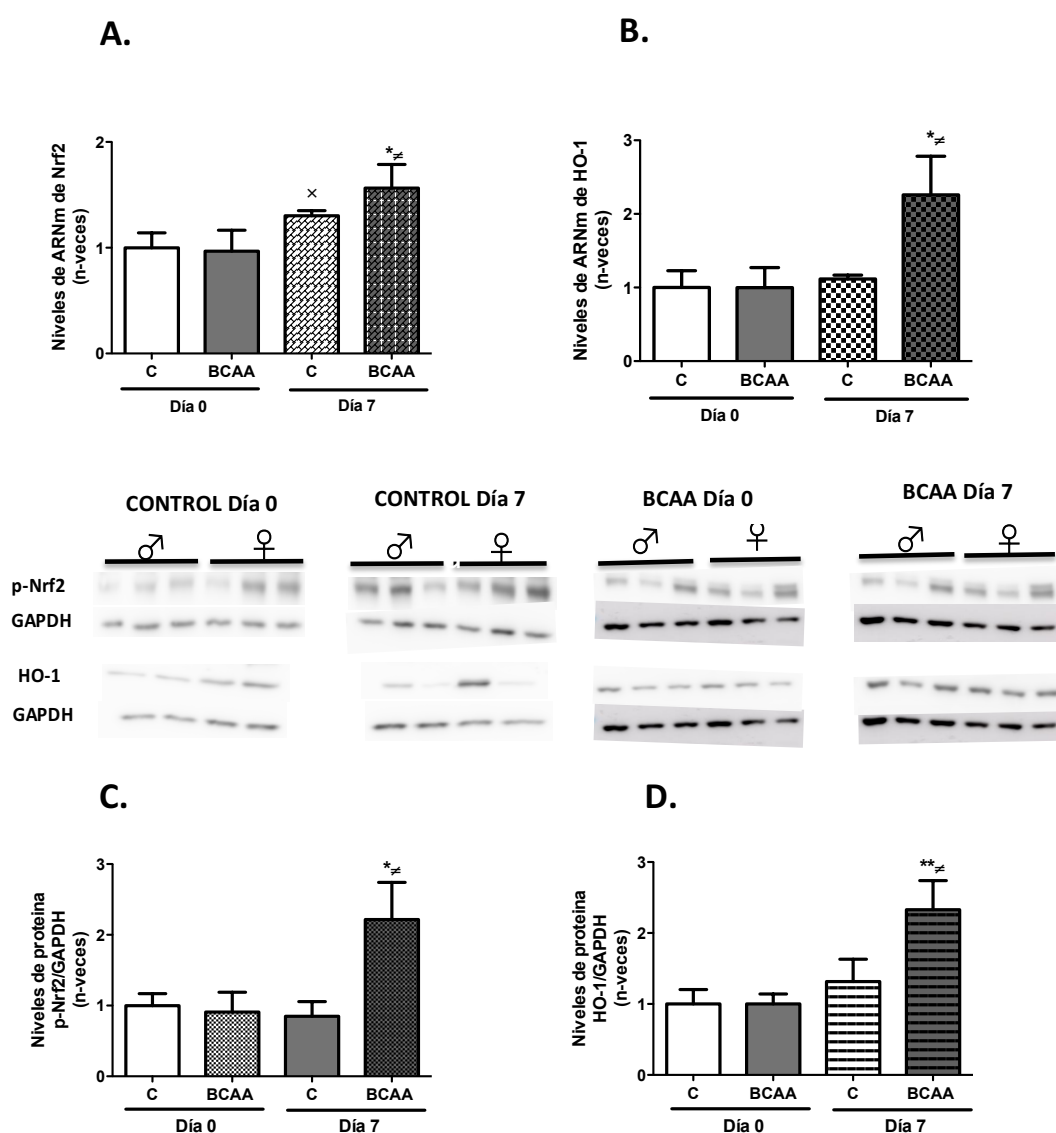


Figura 43. La administración de BCAA induce producción de ROS. (A) La actividad NADPH oxidasa medida por quimioluminiscencia en PBMCs; **(B)** $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial medido por fluorescencia en un lector de placa **(C)** cromatogramas de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la cuantificación del incremento de pico específico de DHE (2-OH-E+) medido por HPLC. C=grupo control día 0 y día 7, BCAA=grupo que tomaron BCAA día 0 y día 7. Los datos expresados como media \pm EEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control. $^{\#}P < 0.5$; $^{\# \#}P < 0.01$ vs BCAA. $n = 10$ por cada grupo.

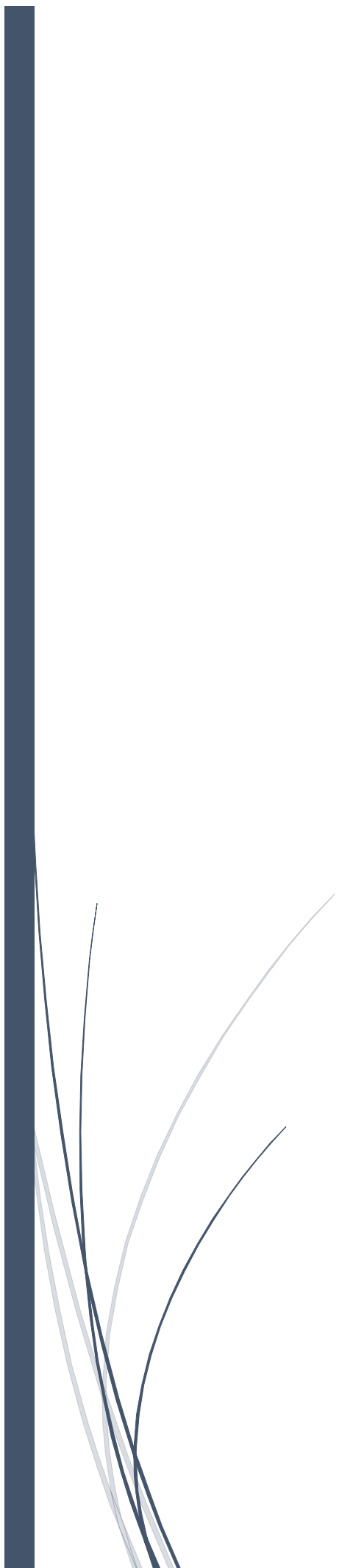
IV. RESULTADOS

3.5. Activación de la respuesta antioxidante y antiinflamatoria en sujetos sanos

Por último, se investigó el estado de la respuesta antioxidante en los participantes en el ensayo. Para ellos, se examinaron las defensas endógenas de las células frente a los ROS y la inflamación como Nrf2 y HO-1. En primer lugar, se determinaron los niveles de ARNm de Nrf2 y HO-1, observándose un aumento significativo de los mismos en el grupo que tomó BCAA durante 7 días en comparación con su estado basal (día 0) o el grupo control (**Figuras 44A y 44B**). Además, los resultados anteriores se correlacionaron con un aumento de niveles proteico tanto de Nrf2 como HO-1 (**Figuras 44C y 44D**). Estos resultados podría indicar que las células activan los mecanismos compensatorios en respuesta a BCAA aunque podrían ser insuficientes si el consumo de los mismos es excesivo y prolongado en el tiempo.



V. DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

En los últimos tiempos, gracias a los avances en metabolómica, se ha conseguido obtener gran cantidad de información sobre los metabolitos más comúnmente implicados en diversas enfermedades metabólicas como DMT2, la obesidad y el cáncer. Los BCAA son unos de los metabolitos de mayor interés científico en la actualidad. La fuerte asociación entre el aumento de los niveles séricos de los BCAA en pacientes obesos y con sobrepeso y resistencia a la insulina [40,42,46,48,203,204], sugiere un papel como predictores futuros de la aparición de la DMT2 [46] y de las complicaciones cardiometabólicas [39,44]. Además en los últimos años se ha observado un creciente uso de estos aminoácidos como suplementos nutricionales para mejorar el rendimiento físico y mental de los por atletas, o como anabolizantes por culturistas [29], sin ningún tipo de restricciones ni advertencias de toxicidad.

Los resultados del trabajo experimental presentado en esta tesis demuestran que los BCAA puede directamente desencadenar los mecanismos que implican la generación del estrés oxidativo y la activación de la vía inflamatoria NF- κ B en células *in vitro* y aortas de ratón, así como en los sujetos sanos sometidos a 7 días con suplementación con BCAA. En consecuencia, el estado pro-inflamatorio y pro-oxidante inducido por los elevados niveles de los BCAA podría contribuir al proceso de disfunción endotelial observado en diferentes patologías favoreciendo el desarrollo de arteriosclerosis, agregación plaquetaria, trombosis y remodelado vascular.

1. EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE BCAA SÉRICOS Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Los mecanismos por los que los BCAA inducen la resistencia a la insulina todavía son desconocidos. Algunos estudios sugieren que la reducción de la captación de BCAA por el tejido adiposo podría ser uno de los mecanismos que conlleva al aumento de los BCAA circulantes en situaciones como la obesidad o el sobrepeso [205].

Otros autores sugieren el papel de la inflamación en el proceso de disfunción mitocondrial en la obesidad que, finalmente conduciría a una disminución de los genes implicados en el metabolismo de los BCAA, de su capacidad de reclutamiento por la mitocondria y de la lipogénesis en el tejido adiposo visceral [205,206]. No obstante, es poco probable que la disfunción mitocondrial *per se* conduzca a la resistencia a la insulina porque en muchos casos esa disfunción es compensada por el aumento de la glucólisis y la fosforilación a nivel del sustrato, reduciéndose por tanto los niveles de glucosa en suero [206]. En este sentido, Newgard y colaboradores propusieron la acumulación de los metabolitos activos procedentes del aumentado consumo de grasas o del catabolismo de BCAA (C3 y C5 acil-carnitinas) como posibles causantes del estrés mitocondrial [44,49]. Por otro lado, además de producir disfunción

mitocondrial directamente, los BCAA podrían activar vías de señalización nutricionales a través del mTORC1 y las distintas quinasas como JNK o IRS-1 contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina [44].

2. LA EXPOSICIÓN A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE LOS BCAA INDUCE UN ESTADO PRO-INFLAMATORIO MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE NF- κ B

Estudios recientes sugieren que la presencia de niveles elevados de los BCAA en el suero de pacientes con MSUD, además de causar daños neurológicos graves, activan el proceso inflamatorio crónico [207], acompañado con aumento de los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 e INF- γ . Uno de los posibles mecanismos propuestos para explicar las graves lesiones cerebrales inducidas por los BCAA es la modulación de las propiedades inmunes de las células de la microglia [27], aumentando el perfil inflamatorio de los pacientes con MSUD [25].

En el presente trabajo, mediante experimentos realizados en células en cultivo, se ha observado que los BCAA, a concentraciones similares a las encontradas en pacientes con MSUD, inducen una respuesta pro-inflamatoria caracterizada por la sobreexpresión de citoquinas (IL-6 y TNF- α) y moléculas de adhesión (ICAM-1, CD40L y E-selectina). Entre los mecanismos de señalización intracelulares involucrados en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias, uno de los más importantes es el que implica al factor de transcripción NF- κ B [76,86,208]. De hecho, en biopsias humanas de pacientes con diversas enfermedades cardiovasculares y modelos experimentales de daño vascular, se ha descrito la existencia de una correlación entre la activación del NF- κ B y el aumento de factores pro-inflamatorios [207–209].

Es importante destacar que por primera vez los resultados contenidos en esta tesis, demuestran que los BCAA directamente causan activación temprana de la ruta clásica del NF- κ B en las células inmunes (PBMC) y células endoteliales *in vitro*. La fosforilación de la subunidad p65 por BCAA se acompañó del aumento de la localización nuclear del complejo activo y la unión a su secuencia consenso de ADN en ambos tipos celulares. Además, se conoce que NF- κ B es un factor de transcripción redox-sensible [21]. Por consiguiente, cuando bloqueamos la generación de ROS se impidió la activación de NF- κ B en PMBC expuestas a BCAA.

Funcionalmente, la activación de las moléculas de adhesión (CD40L y ICAM-1 en PBMC, y E-selectina e ICAM-1 en CE), desencadenada por los BCAA, conferiría una mayor capacidad de migración de los PBMC y la adhesión de diferentes células inflamatorias al endotelio [59,61,179]. Nrf2 es un factor de transcripción expresado en respuesta a las señales oxidantes e inflamatorias que mantiene una estrecha relación cruzada con otros reguladores redox de estrés oxidativo y la inflamación, como NF- κ B [40]. En PBMC se observó la activación del Nrf2 inducida por los BCAA, probablemente como un mecanismo temprano de defensa contra el daño producido por

los BCAA. Sin embargo, la activación del Nrf2 y la expresión de las enzimas antioxidantes dependientes de esta vía, podrían ser insuficiente ya que en presencia de sulforafano (el agonista de la activación del Nrf2) no revirtió la adhesión de PBMC al endotelio.

Los resultados derivados de nuestro trabajo experimental podrían ayudar, al menos en parte, a explicar los daños observados en los pacientes con MSUD, así como aportar nuevos mecanismos de actuación de los BCAA en pacientes obesos y las complicaciones que éstos podrían causar a largo plazo en estas patologías.

3. LA EXPOSICIÓN A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE LOS BCAA ACTIVA LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO VÍA NOX-1, NOX-2 Y LA MITOCONDRIA

El desequilibrio en la producción de ROS es uno de los mecanismos más importantes involucrados en diferentes condiciones patológicas [95,210,211]. Entre las principales fuentes de ROS se encuentran la NADPH oxidasa y la mitocondria. En este trabajo se ha descrito cómo los BCAA activan distintas fuentes de ROS en cultivos celulares, así como en aorta de ratón *ex vivo*. El mecanismo de activación está relacionado con dos subunidades catalíticas de la NADPH oxidasa (NOX-1 y NOX-2), cuya expresión es particularmente importante en células inmunes [90,105,106] y células endoteliales [89]. Mediante diferentes abordajes experimentales, como el tratamiento farmacológico con el inhibidor selectivo de NOX-1 o NOX-2, ML171 o gp91dstat, respectivamente, se ha comprobado que los BCAA producen un aumento en la generación de $O_2^{\bullet-}$, así como en la actividad NADPH oxidasa en PBMC y CE en cultivo. Adicionalmente, encontramos aumentada la expresión de ambas subunidades en respuesta a BCAA en cultivo de CE, confirmando su participación en este proceso. En los experimentos realizados en aorta de ratón *ex vivo*, el uso de ML-171 y el péptido gp91dsta también redujo los aumentos en la producción de $O_2^{\bullet-}$ y la vasoconstricción derivada de la exposición a los BCAA.

Asimismo, los BCAA fueron capaces de activar la fuente mitocondrial de ROS, con la consiguiente desestabilización de la membrana y del potencial osmótico, causando la sobrecarga de Ca^{2+} y la apertura del poro de transición mitocondrial. La disfunción mitocondrial causada por los BCAA puede convertirse en círculo vicioso conduciendo al agotamiento de la energía y, finalmente, a la muerte celular [109] en distintas patologías [110,212]. No obstante, el uso del *scavenger* de ROS mitocondrial, mitotempo, disminuyó en parte la producción de ROS inducida por los BCAA en cultivo celular y redujo la aumentada contracción de aorta de ratón *ex vivo*. Estos resultados sugieren la importancia de ambas fuentes de ROS entre los mecanismos de daño celular causados por los BCAA y la comunicación cruzada que existe entre la mitocondria y la NADPH oxidasa [213].

4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES ACTIVADAS POR LOS BCAA

La vía de señalización intracelular PI3K/Akt/mTORC1 regula la expresión de una gran variedad de genes implicados en procesos de proliferación, diferenciación y migración celular [132,133,135], y su activación desempeña un papel clave en el desarrollo y las complicaciones micro- y macro-vasculares de la diabetes [121,128,214,215]. mTOR juega un papel importante en la regulación positiva de HIF-1 α y VEGF, factores claves en el desarrollo de la retinopatía diabética, y el bloqueo de la vía por rapamicina revierte su desarrollo [215].

Los BCAA son aminoácidos que pueden ejercer efectos intracelulares principalmente a través de la activación del eje de señalización que implica PI3K/Akt, AMPK y mTORC1 [127,128,131, 215].

En el presente trabajo se demuestra que los BCAA promueven la fosforilación de mTORC1 en Ser2448 en PBMC y CE, de forma dosis y tiempo dependiente, siendo la dosis óptima de 10 mM o 6 mM, respectivamente, a tiempos cortos en ambos cultivos. La activación de mTORC1 fue dependiente de Akt, en concordancia con lo descrito previamente en otros tipos celulares [222,223]. Una vez fosforilado en Ser2448, mTORC1 se une a Raptor y a otras proteínas para formar el complejo del enzima activo que señala a través de sus efectores *downstream* 4E-BP1 y S6K [132].

Adicionalmente, se encontró que mTORC1 fue capaz de modular la activación de Akt, lo que sugiere la existencia de una regulación cruzada entre ambas moléculas de señalización.

También se identificó que la activación farmacológica de AMPK por su inductor específico AICAR es una herramienta para limitar la formación del complejo mTORC1 directamente o a través de activación por Akt en respuesta a BCAA. Estos resultados están en línea con estudios previos en otros tipos de células que muestran que AMPK puede prevenir la activación mTORC1 [128,129,131,134,135,214].

Es importante destacar que los efectos de los BCAA sobre la generación de estrés oxidativo, la activación de la inflamación vía NF- κ B, la expresión de proteínas relacionadas con la migración y la adhesión de las PBMC al endotelio fueron abolidas por la rapamicina, que inhibe mTORC1 a través de la unión a la FKBP12 dominio [132]. Los resultados obtenidos destacan el papel central de mTORC1 en la inducción del estado pro-oxidante y pro-inflamatorio de PBMC y CE por BCAA. De hecho, la sobreactivación de mTORC1 se ha asociado con la progresión del síndrome metabólico, el desarrollo futuro de la diabetes tipo 2 y diferentes complicaciones asociadas [216].

Los efectos pro-oxidantes y pro-inflamatorios de los BCAA se observaron a concentraciones que podrían alcanzarse en MSUD [14,30] o en la suplementación diaria con BCAA en deportistas [31], pero es superior a las encontradas en pacientes con obesidad o diabetes [2,7,8,32]. Sin

embargo, en este trabajo experimental se demostró que la exposición crónica a concentraciones más bajas de BCAA (0,5 mM), sumadas a altas concentraciones de glucosa y ambiente pro-inflamatorio, típico de la DMT2, disminuye el umbral de activación de mTORC1 y aumenta la producción de ROS. Por lo tanto, el potencial impacto perjudicial de los BCAA puede ser muy relevante en el contexto de una serie de enfermedades caracterizadas por estrés oxidativo e inflamación.

5. LOS BCAA INDUCEN CAMBIOS EN LA RESPUESTA CONTRÁCTIL VASCULAR Y GENERAN DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Se ha descrito que la sobreexpresión de ROS participa activamente en las alteraciones del tono vascular asociadas a diversas enfermedades, como la hipertensión, la diabetes o la aterosclerosis [90,93,94,187,197].

Existen varios estudios abordando el papel de las NOXs en el proceso de disfunción endotelial que, finalmente, puede conducir al remodelado vascular [101,177]. Así, se demostró que, en presencia de diferentes estímulos, la NOX-1 activa las proteínas implicadas en la proliferación, adhesión y migración celular, entre las que se encuentran la paxilina, Rac, RhoA, cofilina y MMP-9 [95], algunas de ellas activadas vía mTOR [132].

Otra de las subunidades que participa en la disfunción endotelial es NOX-2 que está ampliamente expresada en CMLV, CE, células adventiciales [89], linfocitos [90,105] y monocitos/macrófagos [106]. Además su expresión está directamente relacionada con el factor inflamatorio implicado en el remodelado vascular. Recientemente, un estudio en ratones CD40L -/- infundidos con AngII mostró una menor expresión de NOX-2, T-bet y E-selectina, que se correlacionó con la mejora de la disfunción endotelial y disminución de la infiltración de células inmunes [179].

En este trabajo se ha demostrado que la activación de la señalización redox por los BCAA está ligada a efectos directos sobre la pared vascular, como el aumento en la contracción inducida por fenilefrina o los BCAA, y la inducción de disfunción endotelial en los experimentos realizados en aorta *ex vivo*. El uso de ML-171, gp91dstat y mitotempo en los experimentos *ex vivo*, sirvieron para determinar que la producción de $O_2^{\bullet-}$ contribuye directamente a los cambios observados en la respuesta vascular y a la disfunción endotelial inducidos por BCAA. Los BCAA indujeron una respuesta contráctil de la arteria por si solos a concentraciones acumulativas y elevadas (6 mM). Sin embargo, cuando la aorta se contrajo previamente con una dosis única de fenilefrina, ésta respuesta se produjo a dosis menores (2 mM). Este fenómeno podría deberse a que la fenilefrina activa la liberación del $[Ca^{2+}]_i$, imprescindible en la respuesta contráctil vascular [111,157] y con ello disminuyó la dosis mínima de los BCAA necesaria para desencadenar vasoconstricción.

V. DISCUSIÓN

El mecanismo potencial responsable de la disfunción endotelial causada por los BCAA podría explicarse por la reacción entre el NO derivado de la iNOS (enzima cuya expresión se ha visto aumentada también por el tratamiento con BCAA en CE) y el aumento en la síntesis de $O_2^{\bullet-}$. La reacción que se produce entre ambos factores, NO y $O_2^{\bullet-}$, conduce a la generación de un potente agente pro-oxidante, el peroxinitrito, el cual puede inducir disfunción endotelial en numerosas patologías, incluida la hipertensión, la diabetes, el shock séptico o la aterosclerosis [160,201,202]. Las acciones a través de las cuales el peroxinitrito puede dar lugar a una disfunción endotelial son variadas, ya que puede deberse tanto a sus acciones citotóxicas, como la ruptura del DNA, la peroxidación lipídica y la oxidación, nitración o nitrosilación de gran cantidad de proteínas modificando su función [217], como a la capacidad que posee de inhibir la producción de mediadores de protección endoteliales, como la prostaciclina [218,219]. Además, los peroxinitritos pueden inducir proteólisis por ubiquitinación del I κ B y con ello activar NF- κ B y la transcripción, síntesis y expresión de diversas moléculas inflamatorias. De esta manera, la célula endotelial activada en su genotipo inflamatorio expresa decenas de moléculas, cuyo efecto biológico refleja las diferentes facetas del denominado *fenotipo de disfunción endotelial* [63,94,201,220].

Estos datos relacionan, por primera vez, el aumento de los BCAA en sangre con la posible disfunción endotelial. Además muestran los posibles mecanismos de acción de los BCAA a nivel vascular y sirven para abrir un nuevo campo de visión sobre el consumo “inocuo” de los suplementos que contienen los BCAA. No obstante, aunque los resultados de este trabajo sugieren que la disfunción endotelial mediada por los BCAA es debida a la inducción del estrés oxidativo, desacoplamiento de la eNOS y la sobreexpresión de iNOS, son necesarios estudios adicionales que determinen de una manera más exacta esta hipótesis.

6. LOS EFECTOS ADVERSOS DE LA SUPLEMENTACIÓN EXCESIVA O PROLONGADA CON LOS BCAA EN EL DEPORTE

A pesar de los numerosos efectos positivos del ejercicio físico, se producen algunos cambios fisiológicos negativos en el entrenamiento intensivo de larga duración como disfunción transitoria del sistema inmunológico, aumento de la inflamación y estrés oxidativo. Sin embargo, los atletas de élite que se entrenan intensamente para competir en los niveles más altos pueden contrarrestar los efectos negativos del intenso entrenamiento mediante cambios nutricionales y suplementos, con un teórico refuerzo del sistema inmune [221,222]. Con este propósito, la manipulación de macronutrientes con un uso adecuado de ciertos suplementos puede considerarse como una intervención para reducir los cambios inmunes inducidos por el ejercicio y el riesgo inflamatorio. Los BCAA son los suplementos más comúnmente utilizados tanto por

V. DISCUSIÓN

los atletas para mejorar el rendimiento físico y mental, como por los culturistas con propósitos anabolizantes. Existen combinaciones de los BCAA con micronutrientes dietéticos como los tocoferoles, el docosahexaenoato, vitamina C y los flavonoides por su potente capacidad antioxidante contrarrestando los efectos negativos del daño oxidativo producido durante el ejercicio físico.

No existen estudios concluyentes sobre los beneficios de la administración de los BCAA con el objetivo de disminuir los factores de percepción de la fatiga. Los estudios realizados han relacionado la suplementación de BCAA con una mejora de los síntomas de la fatiga mental, al disminuir la serotonina a nivel cerebral, aunque los resultados a este respecto son poco sólidos y esclarecedores [221,223].

En cambio, los efectos anabolizantes de los BCAA tras el ejercicio intenso podrían explicarse principalmente por el incremento de la hormona de crecimiento y la testosterona [223,224], que actuarían favoreciendo la formación de músculo esquelético y disminuyendo la presencia de ácido láctico en sangre de los deportistas. Otros estudios proponen que la suplementación de BCAA puede promover un aumento de la glutamina plasmática y mejorar la respuesta inmunológica en deportistas [225-227]. No obstante, los estudios realizados hasta ahora presentan muchas limitaciones y no evaluaron la posible toxicidad de la suplementación crónica de BCAA.

En los individuos sanos no obesos el consumo elevado de BCAA a corto plazo es bien tolerado, debido a la capacidad de reserva de BCKDC en el cuerpo y por la inducción de BCKDC en respuesta al exceso de sustrato en condiciones normales [49].

Los resultados del ensayo clínico en sujetos sanos y deportistas descrito en esta tesis, muestran que la suplementación con 6 g de BCAA al día durante una semana incrementan los niveles de los tres aminoácidos hasta 0,56 mM, concentraciones encontrados en pacientes diabéticos y obesos de manera permanente [39,40,42,46].

El incremento de las concentraciones circulantes tras la administración de los BCAA indujo la producción de ROS mitocondriales, la actividad de la NADPH oxidasa y así como la producción del $O_2^{\bullet-}$ determinado por HPLC. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en células *in vitro*, así como en aorta aislada de animales *ex vivo*. Además, podrían apoyar los estudios recientes que proponen al estrés oxidativo como uno de los posibles mediadores implicados en la neuropatología del MSUD [119]. El acúmulo en sangre de los BCAA, y sus metabolitos tóxicos como las acil-carnitinas, podría estar afectando a la homeostasis mitocondrial conduciendo a una mayor generación de ROS [120] y disminuyendo la funcionalidad de las enzimas antioxidantes como catalasa y glutatión peroxidasa [28].

V. DISCUSIÓN

Aún más sorprendente fue el hallazgo de la activación de la principal vía inflamatoria mediada por NF- κ B en esos sujetos sometidos a una dosis diaria de suplementación con los BCAA durante tan solo una semana. En las PBMC de los participantes se observó además un aumento de la fosforilación de p65 que se correlacionó positivamente con el incremento de la expresión génica de diversos factores implicados en la respuesta inflamatoria (IL-6 y TNF- α) y en la activación, la migración y la adhesión de células circulantes (ICAM-1 y CD40L). Aunque los niveles de expresión génica no se correlacionaron con el aumento de los niveles séricos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α . Sin embargo, es plausible que en situaciones de exposición crónica a los BCAA, como es el caso de MSUD, el perfil de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 e INF- γ esté incrementada en el suero de estos pacientes [28], sugiriendo la necesidad de una exposición más prolongada.

Además, probablemente como un mecanismo para proteger las células contra el exceso de producción de ROS y la inflamación generada, se observó un aumento de la activación del Nrf2, el factor de transcripción que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes como HO-1 [111,116]. La suplementación durante 7 días en participantes sanos aumentó la expresión génica y proteica de elementos protectores como el Nrf2 y HO-1, aunque podría ser insuficiente para contrarrestar el efecto pro-inflamatorio y pro-oxidante de los niveles séricos de los BCAA crónicamente elevados, como ocurre en los pacientes con MSUD donde la actividad de las enzimas detoxificantes se encuentra disminuida [28].

Los resultados de este estudio piloto ponen de relieve que el uso de suplementos de BCAA entre los deportistas no sería tan inocuo como se consideraba, sino que pudieran tener efectos tóxicos sobre el organismo humano. Sin embargo, se requiere ampliar el estudio con el fin de evaluar los efectos de consumo de los BCAA a largo plazo (meses o años) en una amplia población de deportistas y en personas con problemas metabólicos de base como son los pacientes con síndrome metabólico y DMT2.

En resumen, el presente estudio experimental demuestra que los BCAA son capaces de activar las respuestas pro-oxidantes y pro-inflamatorias mediadas por PI3K/Akt y mTORC1 en células endoteliales y PBMC *in vitro*. Los efectos desencadenados por los BCAA sobre el estrés oxidativo y la inflamación confieren una mayor capacidad de adhesión endotelial y migración de diferentes células inflamatorias causando potencialmente disfunción endotelial y daño vascular. La persistencia de niveles elevados de BCAA, unido a una disminución de las defensas fisiológicas a largo plazo, podría facilitar la aparición de daño vascular similar a lo observado en una serie de enfermedades cardiovasculares (**Figura 45**). Por lo tanto, el potencial impacto perjudicial de los BCAA sobre las células circulantes y endoteliales debe de ser tenido en cuenta antes de

recomendar la suplementación con BCAA a largo plazo. Además nuestros estudios apoyan la idea de que los posibles efectos adversos de la administración crónica de estos compuestos deberían ser incluidos en la ficha técnica de estos productos nutricionales.

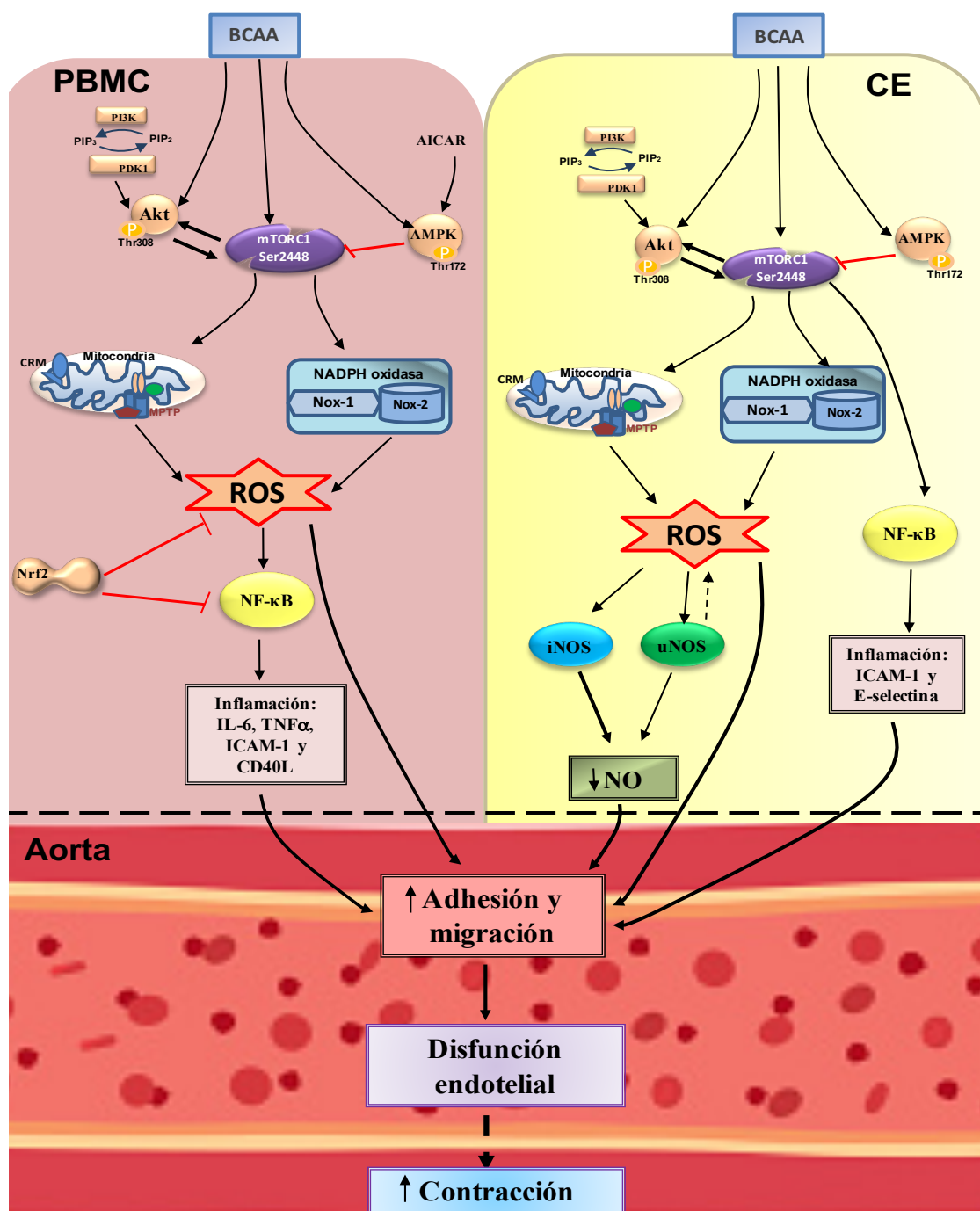


Figura 45. Esquema resumen de los mecanismos por los que la elevación de los BCAA inducen alteraciones en células inmunes circulatorias y endoteliales.

A thick dark blue vertical bar is positioned on the left side of the page. To its right, several thin, curved lines in dark blue and light gray sweep upwards and outwards from the bottom left corner.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los BCAA aumentan la producción de ROS de origen mitocondrial y la actividad de la NADPH oxidasa en PBMC y CE en cultivo, así como en aorta de ratón *ex vivo*. Las subunidades de la NADPH oxidasa, NOX-1 y NOX-2, juegan un papel central en el aumento del estrés oxidativo inducido por los BCAA.
2. El tratamiento con los BCAA en PBMC y CE en cultivo induce la expresión de genes pro-inflamatorios y activa la ruta NF- κ B.
3. Las respuestas pro-inflamatorias inducidas por los BCAA están reguladas por un aumento en la producción de $O_2^{\bullet -}$ derivado de la actividad de NOX-1, NOX-2 y la mitocondria, demostrando la existencia de una interconexión entre los procesos redox e inflamatorios inducidos por los BCAA.
4. Los BCAA ejercen sus efectos intracelulares a través de la activación del eje de señalización que implica PI3K/Akt, AMPK y mTORC1. La inhibición del eje PI3K/Akt/mTORC1 y la activación de AMPK disminuye la generación de estrés oxidativo, la activación de la inflamación vía NF- κ B, la expresión de proteínas relacionadas con la migración y la adhesión de PBMC al endotelio.
5. Los BCAA aumentan la respuesta contráctil vascular y generan disfunción endotelial. Los mecanismos implicados en la inducción de la disfunción endotelial mediada por los BCAA están el estrés oxidativo, el desacoplamiento del eNOS y la sobreexpresión de iNOS.
6. La suplementación con los BCAA en población sana durante 7 días incrementó los niveles séricos de los BCAA a valores similares a los encontrados en pacientes diabético y obesos. La elevación de las concentraciones de los BCAA alcanzada indujo activación del estrés oxidativo y la inflamación por vía NF- κ B en PBMC.

A thick, dark blue vertical bar is positioned on the left side of the page. To its right, several thin, curved lines in shades of blue and grey sweep upwards and outwards, creating an abstract, organic shape.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Scalbert A, Brennan L, Fiehn O, Hankemeier T, Kristal BS, van Ommen B, Pujos-Guillot E, Verheij E, Wishart D, Wopereis S. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research., *Metabolomics*. 5 (2009) 435–458.
- [2] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics., *Nat Biotechnol*. 18 (2000) 1157–61.
- [3] Dunn WB, Goodacre R, Neyses L, Mamas M. Integration of metabolomics in heart disease and diabetes research: current achievements and future outlook., *Bioanal*. 19 (2011) 2205–22.
- [4] Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition., *NMR Biomed*. 18 (2005) 143–62.
- [5] Graça G, Duarte IF, J Goodfellow B, Carreira IM, Couceiro AB, Domingues Mdo R, Spraul M, Tseng LH, Gil AM. Metabolite profiling of human amniotic fluid by hyphenated nuclear magnetic resonance spectroscopy., *Anal Chem*. 80 (2008) 6085–92.
- [6] Bala L, Ghoshal UC, Ghoshal U, Tripathi P, Misra A, Gowda GA, Khetrapal CL. Malabsorption syndrome with and without small intestinal bacterial overgrowth: a study on upper-gut aspirate using ¹H NMR spectroscopy., *Magn Reson Med*. 56 (2006) 738–44.
- [7] Nagana Gowda GA, Shanaiah N, Cooper A, Maluccio M, Raftery D. Visualization of bile homeostasis using (1) H-NMR spectroscopy as a route for assessing liver cancer., *Lipids*. 44 (2009) 27–35.
- [8] Abu Bakar MH, Sarmidi MR, Cheng KK, Ali Khan A, Suan CL, Zaman Huri H, Yaakob H. Metabolomics – the complementary field in systems biology: a review on obesity and type 2 diabetes., 11 (2015) 1742-74.
- [9] Lynch, B. Gern, C. Lloyd, S.M. Hutson, R. Eicher, Vary TC. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 291 (2006) E621-30.
- [10] Holecek M, The BCAA-BCKA cycle: its relation to alanine and glutamine synthesis and protein balance., *Nutrition*. 17 (2001) 70.
- [11] Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, Sugahara K, Yoshizawa F.M. Doi, I. Hypoglycemic effect of isoleucine involves increased muscle glucose uptake and whole body glucose oxidation and decreased hepatic gluconeogenesis., *Am J Physiol. Endocrinol. Metab*. 292 (2007) E1683-93.
- [12] Scarna A, Gijsman HJ, McTavish SF, Harmer CJ, Cowen PJ, Goodwin GM. Effects of a branched-chain
- [13] Fernstrom JD, Branched-Chain Amino Acids and Brain Function., *J Nutr*. 135 (2005) 1539S-46S.
- [14] Kumar MA, Bitla AR, Raju KV, Manohar SM, Kumar VS, Narasimha SR. Branched chain amino acid profile in early chronic kidney disease., *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 23 (2012) 1202–7.
- [15] Chen L, Chen Y, Wang X, Li H, Zhang H, Gong J, Shen S, Yin W, Hu H. Efficacy and safety of oral branched-chain amino acid supplementation in patients undergoing interventions for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis., *Nutr J*. 9 (2015) 67.
- [16] Kanekawa T, Nagai H, Kanayama M, Sumino Y. Importance of branched-chain amino acids in patients with liver cirrhosis and advanced hepatocellular carcinoma receiving hepatic arterial infusion chemotherapy., *Cancer Chemother Pharmacol*. 74 (2014) 899– 909.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [17] Bodoy S, Martin L, Zorzano A, Palacin M, Estevez R, Bertran J. Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity., *J Biol Chem.* 280 (2005) 12002-11.
- [18] Riggs TR, McKirahan KJ. Action of insulin on transport of L-alanine into rat diaphragm in vitro. Evidence that the hormone affects only one neutral amino acid transport system., *J Biol Chem.* 248 (1973) 6450–6455.
- [19] Buchanan J, Popovitch JR, Tapley DF. Leucine transport by rat liver mitochondria in vitro., *Biochim Biophys Acta.* 173 (1969) 532–9.
- [20] Hagenfeldt L, Eriksson S, Wahren J. Influence of Leucine on Arterial Concentrations and Regional Exchange of Amino Acids in Healthy Subjects, *Clin. Sci.* 59 (1980) 173–181.
- [21] Mattick JS, Kamisoglu K, Ierapetritou MG, Androulakis IP, Berthiaume F. Branched-chain amino acid supplementation: impact on signaling and relevance to critical illness., *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 5 (2013) 449–60.
- [22] Hutson SM, Sweatt AJ, Lanoue KF. Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes., *J Nutr Metab.* 135 (2005) 1557S–64S.
- [23] Bonen A, Heynen M, Hatta H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1- MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle., *Appl Physiol Nutr Metab.* 31 (2006) 31–9.
- [24] Hoffmann B, Helbling C, Schadewaldt P, Wendel U. Wendel, Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD., *Pediatr. Res.* 59 (2006) 17–20.
- [25] Mescka CP, Guerreiro G, Donida B, Marchetti D, Wayhs CA, Ribas GS, Coitinho AS, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation., *Metab. Brain Dis.* 30 (2015) 1167–74.
- [26] Contrusciere V, Paradisi S, Matteucci A, Malchiodi-Albedi F. Branched-chain amino acids induce neurotoxicity in rat cortical culture, *Neurotox. Res.* 17 (2010) 392–398.
- [27] De Simone R, Vissicchio F, Mingarelli C, De Nuccio C, Visentin S, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals., *Biochim. Biophys. Acta.* 1832 (2013) 650–9.
- [28] Mescka CP Rosa AP, Schirmbeck G, da Rosa TH, Catarino F, de Souza LO, Guerreiro G, Sitta A, Vargas CR Dutra-Filho CS. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 6007-6017.
- [29] Cruzat, M. Krause, P. Newsholme P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise., *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 11 (2014) 61.
- [30] Pencharz PB, Elango R, Ball RO. Determination of the tolerable upper intake level of leucine in adult men., *J. Nutr.* 142 (2012) 2220S–2224S.
- [31] Rasmussen B, Gilbert E, Turki A, Madden K, Elango R. Determination of the safety of leucine supplementation in healthy elderly men., *Amino Acids.* 48 (2016) 1707-16.
- [32] Ritz P, Berrut G. Mitochondrial function, energy expenditure, aging and insulin resistance., *Diabetes Metab.* 31 (2005) 5S67-5S73.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [33] Frisard M, Ravussin E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process., *Endocrine*. 29 (2006) 27–32.
- [34] Federspil G, Nisoli E, Vettor R. A critical reflection on the definition of metabolic syndrome, *Pharmacol. Res.* 53 (2006) 449–456.
- [35] Katzmarzyk PT, Church TS, Janssen I, Ross R, Blair SN. Metabolic syndrome, obesity, and mortality: impact of cardiorespiratory fitness., *Diabetes Care*. 28 (2005) 391–7.
- [36] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030., *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87 (2010) 4–14.
- [37] Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000., *Diabetes Care*. 28 (2005) 2130–5.
- [38] Korc M. Update on diabetes mellitus., *Dis Markers*. 20 (2004) 161–5.
- [39] Felig P, Marliss E, Cahill GF Jr. Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity., *N. Engl. J. Med.* 281 (1969) 811–6.
- [40] Adibi SA. Influence of dietary deprivations on plasma concentration of free amino acids of man., *J Appl Physiol*. 25 (1968) 52–7.
- [41] Boulet MM, Chevrier G, Grenier-Larouche T, Pelletier M, Nadeau M, Scarpa J, Prehn C, Marette A, Adamski J, Tchernof A. Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 309 (2015) E736–46.
- [42] Nakamura H, Jinzu H, Nagao K, Noguchi Y, Shimba N, Miyano H, Watanabe T, Iseki K. Plasma amino acid profiles are associated with insulin, C-peptide and adiponectin levels in type 2 diabetic patients., *Nutr. Diabetes*. 4 (2014) e133.
- [43] Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, Tanner CJ, Kuchibhatla M, Houmard JA, Newgard CB, Kraus WE. Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women., *Diabetes Care*. 32 (2009) 1678–83.
- [44] Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance., *Cell Metab.* 9 (2009) 311–26.
- [45] Würtz P, Mäkinen VP, Soininen P, Kangas AJ, Tukiainen T, Kettunen J, Savolainen MJ, Tammelin T, Viikari JS, Rönnemaa T, Kähönen M, Lehtimäki T, Ripatti S, Raitakari OT, Järvelin MR, Ala-Korpela M. Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults, *Diabetes*. 61 (2012) 1372–1380.
- [46] Perng W, Gillman MW, Fleisch AF, Michalek RD, Watkins SM, Isganaitis E, Patti ME, Oken E. Metabolomic profiles and childhood obesity., *Obesity (Silver Spring)*. 22 (2014) 2570–8.,
- [47] Svetkey LP, Stevens VJ, Brantley PJ, Appel LJ, Hollis JF, Loria CM, Vollmer WM, Gullion CM,

VII. BIBLIOGRAFÍA

Funk K, Smith P, Samuel-Hodge C, Myers V, Lien LF, Laferriere D, Kennedy B, Jerome GJ, Heinith F, Harsha DW, Evans P, Erlinger TP, Dalcin AT, Coughlin J, Charleston J, Champagne CM, Bauck A, Ard JD, Aicher K. Comparison of strategies for sustaining weight loss: the weight loss maintenance randomized controlled trial., *JAMA*. 299 (2008) 1139–48.

[48] Morris C, O'Grada C, Ryan M, Roche HM, Gibney MJ, Gibney ER, Brennan L. The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids., *Proc. Nutr. Soc.* 71 (2012) 634–8.

[49] Menazza S, Wong R, Nguyen T, Wang G, Gucek M, Murphy E. CypD(-/-) hearts have altered levels of proteins involved in Krebs cycle, branch chain amino acid degradation and pyruvate metabolism., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 56 (2013) 81–90.

[50] YangR,DongJ,ZhaoH,LiH,GuoH,WangS,ZhangC,WangS,WangM,YuS,ChenW. Association of branched-chain amino acids with carotid intima-media thickness and coronary artery disease risk factors., *PLoS One*. 9 (2014) e99598.

[51] Ruiz-Canela M, Toledo E, Clish CB, Hruby A, Liang L, Salas-Salvadó J, Razquin C, Corella D, Estruch R, Ros E, Fitó M, Gómez-Gracia E, Arós F, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Martínez-González MA, Hu FB. Plasma Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial., *Clin Chem*. 62 (2016) 582–92.

[52] Yang RY, Wang SM, Sun L, Liu JM, Li HX, Sui XF, Wang M, Xiu HL, Wang S, He Q, Dong J, Chen WX. Association of branched-chain amino acids with coronary artery disease: A matched-pair case-control study., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 25 (2015) 937–42.

[53] Emanuela F, Grazia M, Marco de R, Maria Paola L, Giorgio F, Marco B. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome., *J Nutr Metab.* 2012 (2012) 476380.

[54] Luft VC, Schmidt MI, Pankow JS, Couper D, Ballantyne CM, Young JH, Duncan BB. Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study., *Diabetol Metab Syndr.* 5 (2013) 31.

[55] Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity., *Annu Rev Immunol.* 29 (2011) 415–45.

[56] Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 993–999.

[57] Bandeira Sde M, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, Rabelo LA, Vasconcelos SM, Goulart MO. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity., *Oxid Med Cell Longev.* 2012 (2012) 819310.

[58] Den Hartigh LJ, Omer M, Goodspeed L, Wang S, Wietecha T, O'Brien KD, Han CY. Adipocyte-Specific Deficiency of NADPH Oxidase 4 Delays the Onset of Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Obesity., *Arter. Thromb Vasc Biol.* 37 (2017) 466-475.

[59] Cachofeiro Ramos V, Cediél Gil E, Lahera Juliá V, de las Heras Jiménez N, Sanz Rosa D, Miana Ortega M. Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial, *Hipertens. Y Riesgo Vasc.* 21 (2004) 347–354.

[60] Pankow JS, Decker PA, Berardi C, Hanson NQ, Sale M, Tang W, Kanaya AM, Larson NB, Tsai

VII. BIBLIOGRAFÍA

- MY, Wassel CL, Bielinski SJ. Circulating cellular adhesion molecules and risk of diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)., *Diabet Med.* 33 (2016) 985–91.
- [61] Urban D, Thanabalasingam U, Stibenz D, Kaufmann J, Meyborg H, Fleck E, Gräfe M, Stawowy P. CD40/CD40L interaction induces E-selectin dependent leukocyte adhesion to human endothelial cells and inhibits endothelial cell migration., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404 (2011) 448–52.
- [62] Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity., *Cell.* 67 (1991) 1033–6.
- [63] Carlos TM, Leukocyte-endothelial adhesion molecules., *Blood.* 84 (1994) 2068–101.
- [64] Bamias G, Clark DJ, Rivera-Nieves J. Leukocyte traffic blockade as a therapeutic strategy in inflammatory bowel disease., *Curr Drug Targets.* 4 (2013) 1490–500.
- [65] Sessa R, Pietro MD, Filardo S, Turriziani O. Infectious burden and atherosclerosis: A clinical issue., *World J Clin Cases.* 2 (2014) 240–9.
- [66] Drexler H, Kurz S, Jeserich M, Münzel T, Hornig B. Effect of chronic angiotensin- converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with chronic heart failure., *Am J Cardiol.* 76 (1995) 13E–18E.
- [67] Gasic S, Wagner OF, Fasching P, Ludwig C, Veitl M, Kapiotis S, Jilma B. Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients with microalbuminuria., *Am J Hypertens.* 12 (1999) 217–22.
- [68] Byrkjeland R, Njerve IU, Arnesen H, Seljeflot I, Solheim S. Reduced endothelial activation after exercise is associated with improved HbA1c in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease., *Diab Vasc Dis Res.* 14 (2017) 94-103.
- [69] Herder C, Fürstos JF, Nowotny B, Begun A, Strassburger K, Müssig K, Szendroedi J, Icks A, Roden M. Associations between inflammation-related biomarkers and depressive symptoms in individuals with recently diagnosed type 1 and type 2 diabetes., *Brain Behav Immun.* 61(2016) 137-145.
- [70] Schalkwijk CG, Smulders RA, Lambert J, Donker AJ, Stehouwer CD. ACE-inhibition modulates some endothelial functions in healthy subjects and in normotensive type 1 diabetic patients., *Eur J Clin Invest.* 30 (2000) 853–60.
- [71] Ferri C, Desideri G, Baldoncini R, Bellini C, De Angelis C, Mazzocchi C, Santucci A. Early activation of vascular endothelium in nonobese, nondiabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities., *Diabetes.* 47 (1998) 660–7.
- [72] Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines., *Lancet.* 349 (1997) 490–5.
- [73] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease., *Circ Res.* . 95 (2004) 858–66.
- [74] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation., *Nature.* 454 (2008) 428– 35.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [75] Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame., *Cell*. 140 (2010) 771–6.
- [76] Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases., *J Clin Invest*. 107 (2001) 7–11.
- [77] Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 1 (2009) a000034.
- [78] Matthew SH, Sankar G. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions, *Genes Dev*. 26 (2012) 203–234.
- [79] Martin AG, Fresno M. Tumor necrosis factor-alpha activation of NF-kappa B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel., *J Biol Chem*. 275 (2000) 24383–91.
- [80] Mathew DJ, Newsom EM, Guyton JM, Tuggle CK, Geisert RD, Lucy MC. Activation of the transcription factor nuclear factor-kappa B in uterine luminal epithelial cells by interleukin 1 Beta 2: a novel interleukin 1 expressed by the elongating pig conceptus., *Biol Reprod*. 92 (2015) 107.
- [81] Toubi E, Shoenfeld Y. Toll-like receptors and their role in the development of autoimmune diseases., *Autoimmun*. 37 (2004) 183–8.
- [82] Weil R, Israël A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-κB in lymphocytes, *Curr. Opin. Immunol*. 16 (2004) 374–381.
- [83] Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-level laser therapy activates NF-κB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts., *PLoS One*. 6 (2011) e22453.
- [84] Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology., *Biochem J*. 382 (2004) 393–409.
- [85] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- [kappa]B activity., *Annu Rev Immunol*. 18 (2000) 621–63.
- [86] Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. NF-kappaB in renal inflammation., *J Am Soc Nephrol*. 21 (2010) 1254–62.
- [87] Hénaut L, Sanz AB, Martin-Sanchez D, Carrasco S, Villa-Bellosta R, Aldamiz-Echevarria G, Massy ZA, Sanchez-Nino MD, Ortiz A. TWEAK favors phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells through canonical and non-canonical activation of NFκB., *Cell Death Dis*. 7 (2016) e2305.
- [88] Wiklund P, Zhang , Pekkala S, Autio R, Kong L, Yang Y, Keinänen-Kiukaanniemi S, Alen M, Wiklund P, Zhang X, Pekkala S, Autio R, Kong L, Yang Y, Keinänen-Kiukaanniemi S, Alen M, Cheng S. Insulin resistance is associated with altered amino acid metabolism and adipose tissue dysfunction in normoglycemic women., *Sci Rep*. 6 (2016) 24540.
- [89] Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities., *Diabetes Care*. 31 Suppl (2008) S170– 80.
- [90] Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health., *Mol Interv*. 11 (2011) 27–35.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [91] Al Ghouleh I, Rodríguez A, Pagano PJ, Csányi G. Proteomic Analysis Identifies an NADPH Oxidase 1 (Nox1)-Mediated Role for Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 2 (ARPC2) in Promoting Smooth Muscle Cell Migration., *Int J Mol Sci.* 14 (2013) 20220–35.
- [92] Ebrahimian T, Touyz RM. Thioredoxin in vascular biology: role in hypertension., *Antioxid Redox Signal.* 10 (2008) 1127–36.
- [93] Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension., *Histochem Cell Biol.* 122 (2004) 339–52.
- [94] Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis., *World J Biol Chem.* 26 (2015) 209–17.
- [95] Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets., *Nat Rev Drug Discov.* 10 (2011) 453–71.
- [96] Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease., *Free Radic Biol Med.* 49 (2010) 687–706.
- [97] Gustafsson S, Lind L, Söderberg S, Zilmer M, Hulthe J, Ingelsson E. Oxidative stress and inflammatory markers in relation to circulating levels of adiponectin., *Obes. (Silver Spring).* 21 (2013) 1467–73.
- [98] Jiang X, Zeng HS, Guo Y, Zhou ZB, Tang BS, Li FK. The expression of matrix metalloproteinases-9, transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptor I in human atherosclerotic plaque and their relationship with plaque stability., *Chin Med J (Engl).* 117 (2004) 1825–9.
- [99] Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and Microvascular Endothelial Dysfunction in Diabetes., *Send to J Diabetes.* (2017) [Epub ahead of print].
- [100] Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease., *Arter. Thromb Vasc Biol.* 27 (2007) 266–74.
- [101] García-Redondo AB, Aguado A, Briones AM, Salaices M. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases., *Pharmacol Res.* 114 (2016) 110-120.
- [102] Frazziano G, Champion HC, Pagano PJ. NADPH oxidase-derived ROS and the regulation of pulmonary vessel tone., *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* 302 (2012) H2166–77.
- [103] Miller AA, Drummond GR, Schmidt HH, Sobey CG. NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries., *Circ Res.* 11 (2005) 055–62.
- [104] Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system., *Hear.* 90 (2004) 491–3.
- [105] Jendrysik MA, Vasilevsky S, Yi L, Wood A, Zhu N, Zhao Y, Koontz SM, Jackson SH. NADPH oxidase-2 derived ROS dictates murine DC cytokine-mediated cell fate decisions during CD4 T helper-cell commitment., *PLoS One.* 6 (2011) e28198.
- [106] Xu Q, Choksi S, Qu J, Jang J, Choe M, Banfi B, Engelhardt JF, Liu ZU. NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation., *J Biol Chem.* 291 (2016) 20030–41.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [107] Nohl H, Hegner D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?, *Eur. J. Biochem.* 82 (1978) 563–7.
- [108] Martínez-Abundis M, Sánchez-Rodríguez MA, Hafidi-bentlakder E. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad, *Bioquímica.* 30 (2005) 10.
- [109] Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (1994) 10771–8.
- [110] Leloup C, Casteilla L, Carrière A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Pénicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation., *Antioxid Redox Signal.* 14 (2011) 519–30.
- [111] Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. When NRF2 talks, who's listening?, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1649–1663.
- [112] Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise, *Physiol. Behav.* 84 (2005) 1–7.
- [113] McCall MR, Frei B., Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1034–1053.
- [114] Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology.* 189 (2003) 41–54.
- [115] Königsberg Fainstein M. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo., *REB.* 26 (2007) 18–25.
- [116] Seldon MP, Silva G, Pejanovic N, Larsen R, Gregoire IP, Filipe J, Anrather J, Soares MP. Heme oxygenase-1 inhibits the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation via inhibition of NF-kappaB RelA phosphorylation at serine 276., *J Immunol.* 179 (2007) 7840–51.
- [117] Jun CD, Kim Y, Choi EY, Kim M, Park B, Youn B, Yu K, Choi KS, Yoon KH, Choi SC, Lee MS, Park KI, Choi M, Chung Y, Oh J. Gliotoxin reduces the severity of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice: evidence of the connection between heme oxygenase-1 and the nuclear factor-kappaB pathway in vitro and in vivo., *Inflamm Bowel Dis.* 2 (2006) 619–29.
- [118] Rushworth SA, MacEwan DJ, O'Connell MA. Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes, *J Immunol.* 181 (2008) 6730–6737.
- [119] Ribas GS, Vargas CR, Wajner M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders, *Gene.* 533 (2014) 469–476.
- [120] Wajner M, Goodman S. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: Insights from human and animal studies. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 43 (2011) 31–38.
- [121] Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *J Cell Sci.* 114 (2001) 2903–10.
- [122] Desai LP, White SR, Waters CM. Cyclic mechanical stretch decreases cell migration by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase- and focal adhesion kinase-mediated JNK1 activation., *J*

Biol Chem. 285 (2010) 4511–9.

[123] Dong W, Zhou M, Dong M, Pan B, Liu Y, Shao J, Gu X, Huang Y, Li G, Wang Y, Sun H. Keto acid metabolites of branched-chain amino acids inhibit oxidative stress-induced necrosis and attenuate myocardial ischemia–reperfusion injury, *J. MolCell Cardiol.* 101 (2016) 90-98.

[124] Zdychová J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications., *Physiol Res.* 54 (2005) 1–16.

[125] Alique M, Civantos E, Sanchez-Lopez E, Lavoiz C, Rayego-Mateos S, Rodríguez-Díez R, García-Redondo AB, Egido J, Ortiz A, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M, Ruiz-Ortega M. Integrin-linked kinase plays a key role in the regulation of angiotensin II- induced renal inflammation., *Clin Sci (Lond).* 127 (2014) 19-31.

[126] Assifi MM, Suchankova G, Constant S, Prentki M, Saha AK, Ruderman NB. AMP- activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289 (2005) E794– 800.

[127] Wilson GJ, Layman DK, Moulton CJ, Norton LE, Anthony TG, Proud CG, Rupassara SI, Garlick PJ. Leucine or carbohydrate supplementation reduces AMPK and eEF2 phosphorylation and extends postprandial muscle protein synthesis in rats., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301 (2011) E1236-42.

[128] Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. Nutrient Excess in AMPK Downregulation and Insulin Resistance., *J Endocrinol Diabetes Obes.* 1 (2013) 1008.

[129] Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart., *J Biol Chem.* 278 (2003) 39422– 7.

[130] Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase., *J Biol Chem.* 1. 270 (1995) 17513–20.

[131] Gleason CE, Lu D, Witters LA, Newgard CB, Birnbaum MJ. The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells., *J Biol Chem.* 282 (2007) 10341–51.

[132] Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling., *Cell Res.* 17 (2007) 666–81.

[133] Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer., *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 433–42.

[134] Memmott RM1, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer, *Cell. Signal.* 21 (2009) 656–664.

[135] Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer., *Int J Mol Sci.* 13 (2012) 1886–918.

[136] Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB., *Mol. Cell.* 22 (2006) 159–68.

[137] Sanchez Canedo C, Demeulder B, Ginion A, Bayascas JR, Balligand JL, Alessi DR,

VII. BIBLIOGRAFÍA

Vanoverschelde JL, Beauloye C, Hue L, Bertrand L. Activation of the cardiac mTOR/p70(S6K) pathway by leucine requires PDK1 and correlates with PRAS40 phosphorylation., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(4) (2010) E761-9.

[138] Casaubon L, Sajan MP, Rivas J, Powe JL, Standaert ML, Farese RV. Contrasting insulin dose-dependent defects in activation of atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt in muscles of obese diabetic humans., *Diabetologia.* 49 (2006) 3000–3008.

[139] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ficha técnica de medicamento: Rapamicina. (2017).

[140] Li L, Wang L, Prise KM, Yu KN, Chen G, Chen L, Mei , Han W. Akt/mTOR mediated induction of bystander effect signaling in a nucleus independent manner in irradiated human lung adenocarcinoma epithelial cells., *Oncotarget.* (2017) [Epub ahead of print].

[141] Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, Khuri FR. Activation of Akt and eIF4E Survival Pathways by Rapamycin-Mediated Mammalian Target of Rapamycin Inhibition, *Cancer Res.* 65 (2005) 7052–8.

[142] Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, Limbad C, Demaria M, Li P, Hubbard GB, Ikeno Y, Javors M, Desprez PY, Benz CC, Kapahi P, Nelson PS, Campisi J. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation., *Nat Cell Biol.* 17 (2015) 1049–61.

[143] Lang CH, Frost RA. Glucocorticoids and TNF α interact cooperatively to mediate sepsis-induced leucine resistance in skeletal muscle., *Mol. Med.* 12 291–9.

[144] Lang CH, Lynch CJ, Vary TC. BCATm deficiency ameliorates endotoxin-induced decrease in muscle protein synthesis and improves survival in septic mice., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299 (2010) R935–44.

[145] Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses., *J Hypertens.* 23 (2005) 767–77.

[146] Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 18 (2013) 51-65.

[147] Lagaud G, Davies KP, Venkateswarlu K, Christ GJ. The physiology, pathophysiology and therapeutic potential of gap junctions in smooth muscle., *Curr Drug Targets.* 3 (2002) 427–40.

[148] Arribas SM, González C, Graham D, Dominiczak AF, McGrath JC. Cellular changes induced by chronic nitric oxide inhibition in intact rat basilar arteries revealed by confocal microscopy., *J Hypertens.* 15 (1997) 1685–93.

[149] Bramich NJ, Brock JA, Edwards FR, Hirst GD, Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 69(2):546-604., *Physiol Rev.* 69 (1989) 546–604.

[150] Gutterman DD. Adventitia-dependent influences on vascular function., *Am J Physiol.* 277 (1999) H1265–72.

[151] Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath I,

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Kotelevtsev Y, Mullins JJ. Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease, *J Biol Chem.* 276 (2001) 36727–33.
- [152] Hirano K, Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle., *J Pharmacol Sci.* 104 (2007) 109–15.
- [153] Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction., *Physiol Rev.* 76 (1996) 967–1003.
- [154] Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system., *Am J Physiol Cell Physiol.* 292 (2007) C82–97.
- [155] Marín J1, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions, *Pharmacol. Ther.* 75 (1997) 111–134
- [156] Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases., *Cardiovasc Res.* 43 (1999) 521–31.
- [157] Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors., *Br J Pharmacol.* 156 (2009) 563–74.
- [158] Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells., *Acta Pharmacol Sin.* 21 (2000) 1–18.
- [159] Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation., *J Cell Physiol.* 184 (2000) 409–20.
- [160] Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Miguel M, Salaices M. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats., *J Cardiovasc Pharmacol.* 39 (2002) 378–88.
- [161] Dalsgaard T, Kroigaard C, Misfeldt M, Bek T, Simonsen U. Openers of small conductance calcium-activated potassium channels selectively enhance NO-mediated bradykinin vasodilatation in porcine retinal arterioles., *Br J Pharmacol.* 160 (2010) 1496–508.
- [162] Savage D, Perkins J, Hong Lim C, Bund SJ. Functional evidence that K⁺ is the non- nitric oxide, non-prostanoid endothelium-derived relaxing factor in rat femoral arteries. *Vascul. Pharmacol.* 40 (2003) 23–28.
- [163] Støen R, Lossius K, Karlsson JO. Acetylcholine-induced vasodilation may depend entirely upon NO in the femoral artery of young piglets., *Br J Pharmacol.* 138 (2003) 39–46.
- [164] Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries., *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* 295 (2009) H1033–H1043.
- [165] Wang A, Nishihashi T, Trandafir CC, Murakami S, Ji X, Shimizu Y, Kurahashi K. Involvement of endothelial cyclo-oxygenase metabolites in noradrenaline-induced contraction of rat coronary artery., *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32 (2005) 628–32.
- [166] Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaices M, Marín J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved., *Br J Pharmacol.* 125 (1998)

1329–35.

[167] Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148 (1987) 1482–1489.

[168] Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease., *J Pathol.* 190 (2000) 244–54.

[169] Dusting GJ, Moncada S, Vane JR. Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid., *Prostaglandins.* 13 (1977) 3–15.

[170] Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels., *Br J Pharmacol.* 95 (1988) 1165–74.

[171] Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)., 291H985-1002. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* 291 (2006) H985–1002.

[172] Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease., *Atherosclerosis.* 202 (2009) 330–44.

[173] Bény JL, von der Weid PY. Hydrogen peroxide: An endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor., *Biochem Biophys Res Commun.* 176 (1991) 378–384.

[174] Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 725–32.

[175] Silva MA, Cau SB, Lopes RA, Manzato CP, Neves KB, Bruder-Nascimento T, Mestriner FL, Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM, Tostes RC. Mineralocorticoid receptor blockade prevents vascular remodelling in a rodent model of type 2 diabetes mellitus., *Clin Sci (Lond).* 129 (2015) 533–45.

[176] Zeng H, Vaka VR, He X, Booz GW, Chen JX1. High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: assessment of the role played by SIRT3 loss., *J Cell Mol Med.* 19 (2015) 1847–56.

[177] G.K. Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, Lyons E, Krause KH, Banfi B, Lambeth JD, Lassègue B, D, Griendling KK. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation., *Arter. Thromb Vasc Biol.* 29 (2009) 480–7.

[178] Schröder K. NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration., *Antioxid Redox Signal.* 20 (2014) 2043–58.

[179] Hausding M, Jurk K, Daub S, Kröller-Schön S, Stein J, Schwenk M, Oelze M, Mikhed Y, Kerafirodi JG, Kossmann S, Jansen T, Schulz E, Wenzel P, Reske-Kunz AB, Becker C, Münzel T, Grabbe S, Daiber A. CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction., *Basic Res Cardiol.* 108 (2013) 386.

[180] Wang X, Zhao S, Su M, Sun L, Zhang S, Wang D, Liu Z, Yuan Y, Liu Y, Li Y. Geraniol improves endothelial function by inhibiting NOX-2 derived oxidative stress in high fat diet fed mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 474 (2016) 182–7.

[181] Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJ. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol.*, *Front Physiol.* 1 (2012) 412.

- [182] Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system., *Circ Res.* 110 (2012) 1364–90.
- [183] Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassègue B, Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype., *Arter Thromb Vasc Biol.* 27 (2007) 42–8.
- [184] Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes., *Circ Res.* 106 (2010) 1253–64.
- [185] Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (2010) 18121–6.
- [186] Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, Dimmeler S, Shah AM, Shah AM, Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase., *Circ Res.* 110 (2012) 1217–25.
- [187] Urso C, Caimi G. Oxidative stress and endothelial dysfunction., *Minerva Med.* 102 (2011) 59–77.
- [188] Li JL, Chen Hm, Li ML, Hua D, Lu Zh, Wang Jk. An optimized assay for transcription factor NF-kappaB with dsDNA-coupled microplate., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 55 (2007) 31–7.
- [189] Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (2005) 5727–32.
- [190] Laurindo FR1, Fernandes DC, Santos CX. Assessment of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation Products, in: *Methods Enzymol.*, 441 (2008) 237–60.
- [191] Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 41 (1977) 19–26.
- [192] Neishabouri SH1, Hutson SM, Davoodi J. Chronic activation of mTOR complex 1 by branched chain amino acids and organ hypertrophy., *Amino Acids.* 47 (2015) 1167–82.
- [193] Liu KA, Lashinger LM, Rasmussen AJ, Hursting SD. Leucine supplementation differentially enhances pancreatic cancer growth in lean and overweight mice., *Cancer Metab.* 2 (2014) 6.
- [194] Gran P, Cameron-Smith D. The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes, *BMC Physiol.* 11 (2011) 10.
- [195] Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C., *Gastroenterology.* 41(1) (2011) 128–40.
- [196] Saleh MC, Wheeler MB. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator., *Diabetologia.* 45 (2002) 174–87.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [197] Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling., *Cell Res.* 21 (2011) 103–15.
- [198] Spijkerman AM, Gall MA, Tarnow L, Twisk JW, Lauritzen E, Lund-Andersen H, Emeis J, Parving HH, Stehouwer CD. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in Type 2 diabetes., *Diabet Med.* 24 (2007) 969–76.
- [199] Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine- induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin, *Br. J. Pharmacol.* 146 (2005) 834–845.
- [200] Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension., *Br J Pharmacol.* 135 (2002) 771–81.
- [201] Storino AM, Contreras MA, Rojano J, Serrano R, Nouel A, Complicaciones de la diabetes y su asociación con el estrés oxidativo: un viaje hacia el daño endotelial, *Rev. Colomb. Cardiol.* 21 (2014) 392–398.
- [202] Ceballos Reyes G, Ramírez Sánchez I, Calzada-Mendoza C, Disfunción endotelial y estrés oxidativo, *Endocrinol. Y Nutr.* 14 (2006) 233–236.
- [203] Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function, *Circulation.* 126 (2012) 1110–1120.
- [204] Herman MA, She P, Peroni OD, Lynch CJ, Kahn BB. Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels., *J Biol Chem.* 285 (2010) 11348–56.
- [205] Burrill JS, Long EK, Reilly B, Deng Y, Armitage IM, Scherer PE, Bernlohr DA. Inflammation and ER stress regulate branched-chain amino acid uptake and metabolism in adipocytes., *Mol Endocrinol.* 29 (2015) 411–20.
- [206] Curtis JM, Hahn WS, Stone MD, Inda JJ, Drouillard DJ, Kuzmicic JP, Donoghue MA, Long EK, Armien AG, Lavandero S, Arriaga E, Griffin TJ, Protein carbonylation and adipocyte mitochondrial function., *J Biol Chem.* 287 (2012) 32967–80.
- [207] Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II., *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 15 (2006) 159–66.
- [208] López-Franco O, Hernández-Vargas P, Ortiz-Muñoz G, Sanjuán G, Suzuki Y, Ortega L, Blanco J, Egido J, Gómez-Guerrero C. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis., *Arter. Thromb Vasc Biol.* 26 (2006) 1864–70.
- [209] Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gómez-Hernández A, Muñoz-García B, Vega M, Serrano J, Ortega L, Hernández G, Tuñón J, Egido J. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month., *Stroke.* 36 (2005) 1796–800.
- [210] Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular disease, *Hypertension.* 49(4) (2014) 359–370.
- [211] Angelova PR, Abramov AY. Functional Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in

VII. BIBLIOGRAFÍA

Physiology., Free Radic Biol Med. 100 (2016) 81-85.

[212] Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Giorgio M Mitochondria and vascular pathology. Pharmacol. Reports, 61(2009) 123-30.

[213] Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases, Free Radic. Biol. Med. 51 (2011) 1289–1301.

[214] Agarwal S, Bell CM, Rothbart SB, Moran RG. AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Control of mTORC1 Is p53- and TSC2-independent in Pemetrexed-treated Carcinoma Cells, J. Biol. Chem. 290 (2015) 27476–27486.

[215] Wei J, Jiang H, Gao H. Blocking Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Attenuates HIF-1 α Pathways Engaged-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Diabetic Retinopathy., Cell Physiol Biochem. 40 (2016) 1570–1577.

[216] Lieberthal W, Levine JS. Mammalian target of rapamycin and the kidney. II. Pathophysiology and therapeutic implications. Am J Physiol Renal Physiol. 303 (2012) F180-91.

[217] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly., Am J Physiol. 271 (1996) C1424–37.

[218] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology., Br J Pharmacol. 147 Suppl (2006) S193–201.

[219] Münzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?, Eur Hear. J. 31 (2010) 2741–8.

[220] Roberts CK, Won D, Pruthi S, Lin SS, Barnard RJ. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. Diabetes Res Clin Pr. 73(3) (2006) 249–59.

[221] Bescós García R. Branched-chain amino acids as ergogenic supplement in sports. Arch. Med. Deport. XX (2003) 429–434.

[222] Cruzat VF, Krause M, Newsholme P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise., J Int Soc Sport. Nutr. 14;11(1) (2014) 61.

[223] Blomstrand E. Amino acids and central fatigue., Amin Acids. 20 (2001) 25–34.

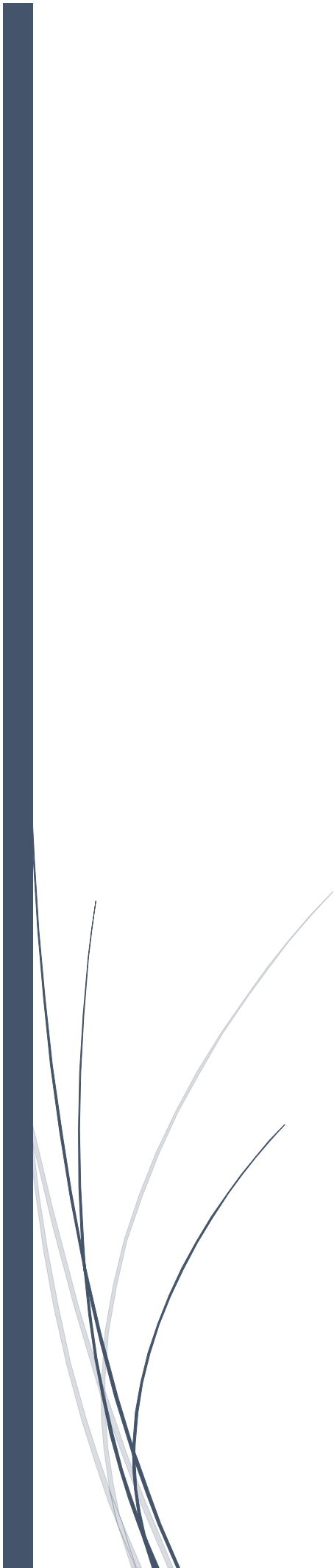
[224] Mero A, Pitkänen H, Oja SS, Komi PV, Pöntinen P, Takala T. Leucine supplementation and serum amino acids, testosterone, cortisol and growth hormone in male power athletes during. J Sports Med Phys Fitness. 37(1997) 137-45.

[225] De Palo EF, Gatti R, Cappellin E, Schiraldi C, De Palo CB, Spinella P. Plasma lactate, GH and GH- binding protein levels in exercise following BCAA supplementation in athletes., Amin. Acids. 20 (2001) 1–11.

[226] Bassit RA, Sawada LA, Bacurau RF, Navarro F, Costa Rosa LF. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes., Med Sci Sport. Exerc. 32 (2000) 1214–9.

[227] Coombes JS, McNaughton LR. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise., J Sport. Med Phys

VIII. ANEXOS



VIII. ANEXOS

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation.

Zhenyukh O, Civantos E, Ruiz-Ortega M, Sánchez MS, Vázquez C, Peiró C, Egido J, Mas S. Free Radical Biology & Medicine. 2017 Mar;104:165-177.

Branched-chain amino acids promote endothelial dysfunction *ex vivo* by activation of oxidative stress and inflammation.

Zhenyukh O, Gonzalez Amor M, Rodrigues-Diez RR, Estevan V, Ruiz-Ortega M, Salaices M, Briones AM, Mas S, Egido J.
En fase de redacción.

Branched-chain amino acid supplementation induce oxidative and inflammatory status in healthy sportmen after 7 day daily administration.

Zhenyukh O, de Nicolas R, Vazquez C, Prieto L, Mas S, Egido J.
En fase de redacción.

Otras publicaciones conseguidas durante el desarrollo de esta tesis:

Sitagliptin ameliorates oxidative stress in experimental diabetic nephropathy by diminishing the miR-200a/Keap-1/Nrf2 antioxidant pathway.

Civantos E, Bosch E, Ramirez E, **Zhenyukh O**, Egido J, Lorenzo O, Mas S.
Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.
Recientemente aceptado en Marzo de 2017.

HuR mediates the synergistic effects of angiotensin II and interleukin 1 β on vascular COX-2 expression and cell migration.

Aguado A, Rodríguez C. Martinez S, Avendaño MS, **Zhenyukh O**, Orriols M, Martínez González José, Alonso MJ, Briones A, Dixon D, Salaices M.
British Journal of Pharmacology. 2015 Jun;172(12):3028-42.

MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways.

Simões M, Aguado A, Fiorim J, Silveira EA, Azevedo BF, Toscano CM, Zhenyukh O, Briones A, Alonso, MJ, Vassallo DV, Salaices M.
Toxicology and Applied Pharmacology. 2015 Mar 1;283(2):127- 38.

Mercury induces proliferation and changes in phenotype in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways.

Aguado A*, Galán M*, **Zhenyukh O**, Wiggers GA, Roque FR, Redondo S, Peçanha F, Martin A, Fortuño A, Cachofeiro V, Tejerina T, Salaices M, Briones AM.
Toxicology and Applied Pharmacology. 2013 Apr 15;268(2):188-200.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas nacionales e internacionales:

Altos niveles de aminoácidos alifáticos de cadena ramificada promueven la disfunción endotelial mediante la inucción de estrés oxidativo y la inflamación. **Zhenyukh Olha**, González Amor Maria, Rodríguez-Diez Raul, Estevan Vanesa, Civantos Esther, Bosch-Panadero Enrique, Ruiz-Ortega Marta, Briones Ana Maria, Mas Sebastian, Egido Jesús. SEH-LELHA en Marzo 2017 en Madrid, España. **(ePoster, premio a mejor póster)**

El bisfenol-A y p-cresol ejercen toxicidad tubular a través del mecanismo de disfunción mitocondrial. Implicaciones en la hemodiálisis. Bosch-Panadero Enrique, Mas Sebastian, Egido Jesús, **Zhenyukh Olha**, Ruiz-Ortega Marta, Emilio González Parra. SEH-LELHA en Marzo 2017 en Madrid, España. **(Comunicación oral)**

Branched-Chain Amino Acids Promote Oxidative Stress, Inflammation And Migration Of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Via mTORC1 Activation. **Olha Zhenyukh**, Esther Civantos, Enrique Bosch, Marta Ruiz-Ortega Concepción Peiró, Sebastian Mas, Jesus Egido. American Society of Nephrology en Noviembre 2016 en Chicago, USA. **(Póster)**

Los aminoácidos alifáticos de cadena ramificada inducen estrés oxidativo, inflamación y migración en células mononucleares de sangre periférica vía mTORC1. **Olha Zhenyukh**, Esther Civantos, Enrique Bosch, María Soledad Sánchez, Clotilde Vázquez, Concepción Peiró, Jesús Egido, Sebastián Mas. XII REUNIÓN de la Sociedad Madrileña de Nefrología en Junio 2016 en La Granja de San Ildelfonso, España. **(Póster)**

Impacto de las membranas de hemodialisis con o sin Bisfenol A sobre el estrés oxidativo y la inflamación. Enrique Bosch-Panadero, Sebastian Mas, Didier Sánchez Ospina, Esther Civantos Martín, **Olha Zhenyukh**, Vanesa Camarero, Pedro Abaigar, Jesus Egido, Emilio González Parra. XII REUNIÓN de la Sociedad Madrileña de Nefrología en Junio 2016 en La Granja de San Ildelfonso, España. **(Póster)**

Circulating branched-chain amino acids are associated with low grade of inflammation in type 2 diabetes. **Olha Zhenyukh**, Esther Civantos, María Soledad Sánchez, Clotilde Vázquez, Concepción Peiró, Jesús Egido, Sebastián Mas. 53rd European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) en Mayo 2016 en Viena, Austria. **(Póster)**

BPA content in hemodialysis membranes impact on redox status and inflammation. Enrique Bosch-Panadero, Sebastian Mas, Didier Sánchez Ospina, Esther Civantos Martín, **Olha Zhenyukh**, Vanesa Camarero, Pedro Abaigar, Jesus Egido and Emilio González Parra. 53rd European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) en Mayo 2016 en Viena, Austria. **(Póster)**

Altos niveles de aminoácidos alifáticos de cadena ramificada circulantes en diabetes pueden causar bajo grado de inflamación y estrés oxidativo. **Olha Zhenyukh**, Esther Civantos, María Soledad Sánchez, Clotilde Vázquez, Marta Ruiz-Ortega, Concepción Peiró, Jesús Egido, Sebastián Mas. SEH-LELHA en Marzo 2016 en Valencia, España. **(Comunicación oral)**

NEFA induces tubular damage via CPT-1 inhibition and energy depletion and could be reversed by malonyl-CoA modulation. Mas Sebastian, Bosch Enrique, Civantos Esther, **Zhenyukh Olha**, Cannata Ortiz Pablo, Egido Jesus. American Society of Nephrology en Noviembre 2014 en Philadelphia, USA. **(Póster)**



Original article

High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation



Olha Zhenyukh^a, Esther Civantos^a, Marta Ruiz-Ortega^{a,*}, Maria Soledad Sánchez^b, Clotilde Vázquez^c, Concepción Peiró^d, Jesús Egido^{a,1}, Sebastián Mas^{a,1}

^a Renal, Vascular and Diabetes Research Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Spain and Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Spain

^b Division of Hematology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^c Division of Endocrinology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^d Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

BCAA
Peripheral blood mononuclear cells
mTORC1
PI3K/Akt
Inflammation
Oxidative stress

ABSTRACT

Leucine, isoleucine and valine are essential aminoacids termed branched-chain amino acids (BCAA) due to its aliphatic side-chain. In several pathological and physiological conditions increased BCAA plasma concentrations have been described. Elevated BCAA levels predict insulin resistance development. Moreover, BCAA levels higher than 2 mmol/L are neurotoxic by inducing microglial activation in maple syrup urine disease. However, there are no studies about the direct effects of BCAA in circulating cells. We have explored whether BCAA could promote oxidative stress and pro-inflammatory status in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy donors. In cultured PBMCs, 10 mmol/L BCAA increased the production of reactive oxygen species (ROS) via both NADPH oxidase and the mitochondria, and activated Akt-mTOR signalling. By using several inhibitors and activators of these molecular pathways we have described that mTOR activation by BCAA is linked to ROS production and mitochondrial dysfunction. BCAA stimulated the activation of the redox-sensitive transcription factor NF- κ B, which resulted in the release of pro-inflammatory molecules, such as interleukin-6, tumor necrosis factor- α , intracellular adhesion molecule-1 or CD40L, and the migration of PBMCs. In conclusion, elevated BCAA blood levels can promote the activation of circulating PBMCs, by a mechanism that involving ROS production and NF- κ B pathway activation. These data suggest that high concentrations of BCAA could exert deleterious effects on circulating blood cells and therefore contribute to the pro-inflammatory and oxidative status observed in several pathophysiological conditions.

1. Introduction

Branched-chain aminoacids (BCAA: leucine, isoleucine and valine) are essential aminoacids. The intricate cellular balance of amino acid influx and efflux is maintained by A- and L-system of protein transpor-

ters which are regulated by hormones and amino acid starvation [1–3]. Unlike most amino acids, only a minor fraction of the dietary BCAA are metabolized by the liver; while the largest part of them enter to the systemic circulation to reach their main metabolism sites, including skeletal muscles, adipose tissue and brain [4,5].

Abbreviations: AICAR, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; AP, alkaline phosphatase; BCAA, branched-chain amino acids; BCKDC, branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex; BSA/PBS, bovine serum albumin/phosphate-buffered saline; CD40L, CD40 ligand; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; DPI, Diphenyleneiodonium chloride; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HRP, Horseradish peroxidase; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IL-6, Interleukin-6; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; Mito-TEMPO, 2,2,6,6-tetramethyl-4-[[2-(triphenylphosphonio)acetyl]amino]-1-piperidinyloxy, monochloride, monohydrate; mTORC, mammalian target of rapamycin complex; NF- κ B, nuclear transcription factor- κ B; Nrf2 or NFE2L2, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; O $_2^{\cdot -}$, Superoxide anion radical; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; p-NPP, p-Nitrophenyl Phosphate; ROS, Reactive Oxygen Species; RT-PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction; PI3K/Akt, phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TMRM, Tetramethyl rhodamine methyl ester; TNF α , Tumor necrosis factor alpha; UCP-2, uncoupling protein 2; $\Delta\psi_m$, mitochondrial membrane potential

* Corresponding author.

E-mail addresses: v.zhenyukh@fjd.es (O. Zhenyukh), ECivantos@idcsalud.es (E. Civantos), MRuizO@fjd.es (M. Ruiz-Ortega), MSanchezF@fjd.es (M.S. Sánchez), clotilde.vazquez@quironsalud.es (C. Vázquez), concha.peiro@uam.es (C. Peiró), JEgido@quironsalud.es (J. Egido), SMas@fjd.es (S. Mas).

¹ These authors have jointly directed this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.009>

Received 4 July 2016; Received in revised form 23 December 2016; Accepted 6 January 2017

Available online 13 January 2017

0891-5849/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

In several pathological and physiological conditions increased BCAA plasma concentrations have been found. More than 50 years ago, slight but significant elevation of BCAA levels, between 0.38 and 0.67 mmol/L, were reported in obese subjects [6,7] as compared to 0.28–0.5 mmol/L in healthy population [8,9]. Later on, different metabolomics studies found out a negative association between plasma BCAA concentrations and insulin sensitivity in overweight and obese patients [10,11], suggesting that BCAA could be involved in insulin-related disorders. Genetic deficiency of BCAA catabolism leads to metabolic diseases, such as the maple syrup urine disease (MSUD) which is caused by a deficiency of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex (BCKDC). MSUD patients present highly elevated BCAA concentrations in a range between 1 and 4 mmol/L, which are responsible of several neurological damage [12,13]. However, the mechanisms involved in this pathological process are poorly understood. Some studies suggested that BCAA are neurotoxic *per se* and enhance excitotoxicity in cortical neuronal cells through mechanisms that require the presence of astrocytes [14]. In addition, recent studies have reported that BCAA modulate the immune properties of microglial cells [15] and increased the inflammatory profile of MSUD patients [13].

The deficient mice in branched chain aminotransferase (BCATm KO), the first BCAA catabolic enzyme presented elevated plasma and tissue BCAA levels associated to heart, kidney and spleen hypertrophy [16]. However, there are no information about the potential direct effects of BCAA in circulating blood cells.

BCAA were known to exert several cell signalling responses mainly via the activation of the mammalian target of rapamycin (mTORC1) axis, which can result in hypertrophy [16], proliferation and migration in cancer cells [17] and in insulin resistance [11,18]. The conserved serine/threonine kinase mTOR is a downstream effector of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate kinase (PI3K/AKT) which can form two distinct multiprotein complexes, mTORC1 and mTORC2. mTORC1 but not the mTORC2 is activated by diverse stimuli, such as growth factors, nutrients, energy and stress signals, via PI3K, MAPK or AMPK, in order to regulate cell growth, proliferation and survival [19,20]. Only mTORC1, but not mTORC2 is sensitive to rapamycin inhibition [21]. In cancer cells, the activation of mTOR signalling has also been linked to the generation of oxidative stress and the release of pro-inflammatory cytokines, mediated by the activation of the nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) [22].

Despite the established association between elevated circulating BCAA and their deleterious effects, little is known about the capacity of BCAA to directly contribute to the pro-inflammatory and pro-oxidant status. The redox-sensitive nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) is a major player in inflammation-related responses in cardiovascular disease [23], but there are not studies about BCAA effects in this signalling pathway.

In the present study, we have explored whether extracellular BCAA could exert deleterious effects on circulating blood cells (PBMCs), the major cell type involved in the pathogenesis of inflammatory diseases) by the induction of oxidative processes and the up-regulation of pro-inflammatory factors. Moreover, the study aimed to gain insight into the signalling mechanisms activated by BCAA with particular emphasis on NF- κ B pathway.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BCAA were prepared as a mixture of leucine, isoleucine and valine at 0.2–12 mmol/L from Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), lipopolysaccharide (LPS; 1 μ g/ml), glucose (30 mmol/L), insulin (1 nmol/L), rapamycin (100 nmol/L), wortmannin (1 μ mol/L), diphenyliodonium chloride (DPI; 10 μ mol/L), and sulforaphane (20 μ mol/L) were obtained from Sigma Aldrich. 5-Aminoimidazole-4-

carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR; 0.5 mmol/L) was purchased from Toronto Research Chemicals, while BAY-11-7082 (1 mmol/L) and ML171 (0.5 μ mol/L) were from Calbiochem (La Jolla, CA), mitochondria (0.5 μ mol/L) was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) and gp91dstat (5 μ mol/L) was from Anaspec (Fremont, CA). IL-6 (10² U/ml) and TNF- α (30 ng/ml) were purchased from Preprotech (Preprotech, London UK). Medium RPMI and fetal bovine serum (FBS) were from Sigma Aldrich.

2.2. Cell culture

Primary cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were obtained at the Blood bank from Fundación Jiménez Díaz (FJD) after written informed consent. The procedure was approved by the Research Ethics Committee of Instituto de Investigaciones Sanitarias FJD. PBMCs were isolated by density centrifugation in Lymphoprep separation medium (MP Biomedicals, Illkirch, France), and cultured in medium RPMI containing 5.5 mmol/L glucose and supplemented with 1% FBS, as described earlier [24].

2.3. Western blot

Whole cell lysates were harvested in lysis buffer [25]. Lysates (30–50 μ g per lane) were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad), and incubated with primary antibodies against p-mTOR (Ser2448), mTOR, p-Akt (Thr308), Akt, Nrf2, UCP-2 (C-terminal) (1/500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), p-AMPK (Thr172 or Ser485/491) and AMPK, p-p65 (1/500; Cell Signalling, Boston, MA, USA), GAPDH (1/1000; Merck-Millipore). Appropriate HRP-labelled anti-mouse (1/5000, DAKO Cytomation) or anti-rabbit (1/5000, Santa Cruz Biotechnology) secondary antibodies were subsequently used for 1 h at room temperature. The signal was detected using Luminata Forte (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) with a ImageQuant LAS 4000 gel documentation system (GE Healthcare) and normalized to GAPDH.

2.4. RNA analysis

Cells were harvested in TRIzol (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) to obtain total RNA, which was reverse transcribed using a high capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR (qPCR) was performed in 7500 Fast ABI System (Life Technologies Inc.) using commercial human Taqman assays: IL-6: Hs00174131_m1; TNF α : Hs00174128_m1; ICAM-1: Hs00164932_m1; CD40L: Hs00163934_m1; 18S rRNA: 4310893E.

2.5. Indirect immunofluorescence

PBMCs were fixed using phosphate buffered 4% paraformaldehyde and permeabilised with 0.02% Triton X-100 for 10 min at RT. After blockade in 3% bovine serum albumin/phosphate-buffered saline (BSA/PBS), PBMCs were incubated with primary antibodies against p-p65 antibody (1/200, NF- κ B-p65 C-20, Santa Cruz) or p-Nrf2 (1/200, Biorbyt, United Kingdom) overnight at 4 °C, followed by incubation with a secondary Alexa 488-conjugated anti-rabbit antibody (1/200; Life Technology) for 1 h at RT. For nuclear counterstaining 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1/5000, Sigma Aldrich) was used and the cells were visualized with a confocal microscope (Leica TCS SP2 with a 40 \times objective).

2.6. NADPH oxidase activity

The O₂^{•−} production generated by NADPH oxidase activity was determined by a chemiluminescence assay, as described [26]. Briefly, PBMCs were rinsed with PBS and harvested in phosphate buffer pH 7.4 (50 mmol/L KH₂PO₄, 1 mmol/L EGTA, 150 mmol/L sucrose). The

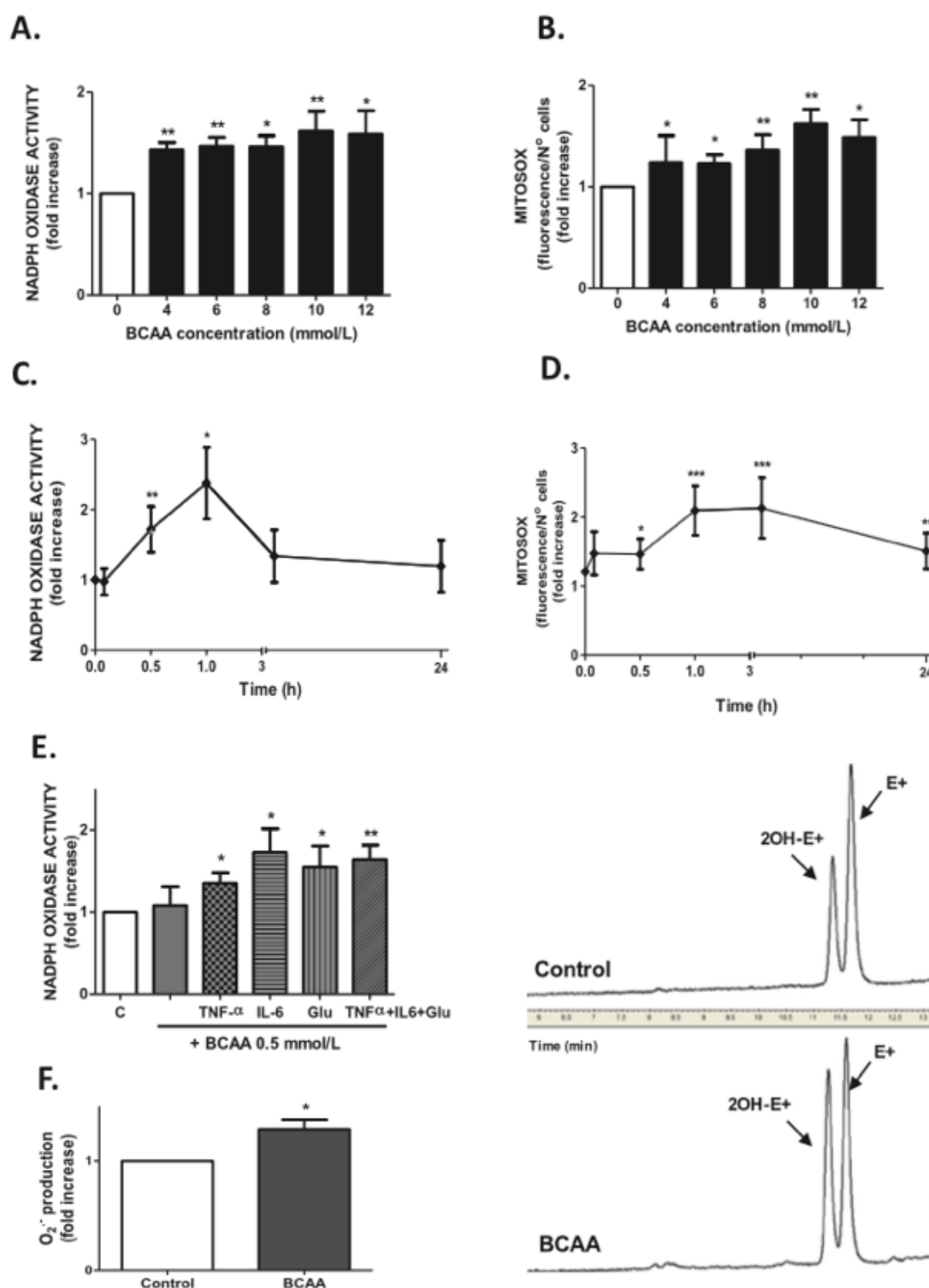


Fig. 1. BCAA activate oxidative stress in PBMCs. Cells were exposed to (A) (B) increasing concentrations of BCAA (4–12 mmol/L) for 1 h (C) (D) 10 mmol/L of BCAA for increasing time periods to determine NADPH oxidase activity which was measured in total cellular extracts by chemiluminescence assay and Mitosox by fluorescence was measured in plate luminometer (Enspire Perkin Elmer). (E) PBMCs were exposed to lower BCAA concentration (0.5 mmol/L) for 1 h with and without pro-inflammatory cytokines (IL-6, 102 U/ml or TNF- α , 30 ng/ml) and high glucose (Glu, 30 mmol/L) (F) Chromatogram of $O_2^{\cdot -}$ production by HPLC analysis. $O_2^{\cdot -}$ production was evaluated by an increase in 2-OH-E $^+$ generation by HPLC analysis of DHE fluorescence in PBMCs stimulated with BCAA. The levels were expressed as fold increase over control (considered 1). Data are expressed as mean \pm SEM. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.005 vs Control. n = 6–8.

reaction was started by the addition of a lucigenin mixture 5 μ mol/L) and NADPH (100 μ mol/L) (Sigma-Aldrich) to the protein sample in a final volume of 250 μ L. Chemiluminescence was determined every 2.4 s for 3 min in a microtiter plate luminometer (Enspire Perkin Elmer). Basal activity in the absence of NADPH was subtracted from each reading and normalized to protein concentration.

2.7. Assessment of intracellular mitochondrial superoxide production and membrane potential

The mitochondrial membrane potential was measured using the fluorescent probe tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). PBMCs were incubated with 150 μ mol/L TMRM (Life Technologies) at 37 $^{\circ}$ C for 10 min and then analysed by flow cytometry at 549 nm (FACScan; BD

Biosciences, San Jose, CA). For quantifying the production of mitochondrial superoxide, PBMCs were incubated with MitoSOX Red (0.5 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min in the dark, and counterstained with DAPI (Sigma). The cells were then analysed by flow cytometry or visualized with a confocal microscope (Leica TCS SP2, 40X objective).

2.8. Measurement of $\text{O}_2^{\cdot-}$ production by high-performance liquid chromatography

Cell samples were homogenized in acetonitrile (300 μl), sonicated, centrifuged (12,000 rpm, 15 min at 4 °C), and the supernatant was collected and dried. Pellet was resuspended in Krebs-HEPES-DTPA 25 $\mu\text{mol/L}$, and 5 μl was used for protein determination. Samples (4 μg) were filtered (0.22 μm) and analysed by HPLC (Agilent Technologies 1200 series, Santa Clara, CA) using a 5 μm C-18 reverse-phase column (Kinetex 150 \times 4.6 mm; Phenomenex, Torrance, CA) and a gradient of solutions A (pure acetonitrile) and B (water/10% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid, v/v/v) at a flow rate of 0.4 ml/min and run. Ethidium and 2-OH-E⁺ were monitored by fluorescence detection with excitation at 480 nm and emission at 580 nm. The 2-OH-E⁺ peak reflects the amount of $\text{O}_2^{\cdot-}$ formed in the tissue during the incubation per microgram of protein. The increase of 2-OH-E⁺ peak was represented by an increase (n-fold) versus control. To optimize the HPLC analysis, 5 $\mu\text{mol/L}$ DHE was incubated with xanthine/xanthine oxidase (0–50 $\mu\text{mol/L}$ /0.1 U/ml) in KHS-HEPES containing 100 $\mu\text{mol/L}$ diethylenetriamine pentaacetic acid (KHS-HEPES/DTPA) at 37 °C for 30 min.

2.9. DNA binding assay

DNA binding assay was performed as described by Li et al. with minor modifications [27]. Oligonucleotides for NF- κB and Nrf2 (0.125 pmol/ μl) and NF- κB and Nrf2 complementary sequences (50 nmol/L) were synthesized by Invitrogen. Primary antibodies were used for p65 (1/200, Cell Signalling, Boston, MA, USA) and Nrf2 (1/200, Biorbyt, United Kingdom) detection. A donkey anti rabbit Alexa 488 or 633 (1/2000, Life Technology) secondary antibody was used for p65 or p-Nrf2 detection, respectively, in a microtiter plate fluorimeter (Enspire, Perkin Elmer). Data were represented as fluorescence intensity (488 or 633 nm), respectively.

2.10. Cell migration assay

The migration of PBMCs was examined using a 6.5 mm transwell chamber with an 8 μm pore size (Corning Costar Inc., Corning, NY). Cells were allowed to migrate for 1 h after stimulation. Migration values were determined by counting three fields per chamber in a confocal Leica TCS SP2 (40 \times objective) and calculated as fold-increase over control.

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error (SEM). n means the number of blood samples from healthy donors. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney statistical and multiple comparison by Kruskal-Wallis, with a significance level chosen at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. BCAA promote time- and dose-dependent oxidative stress

We examined the impact of extracellular BCAA on two main cellular sources of superoxide anions ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generation, such as NADPH oxidase and the mitochondria. Firstly, PBMCs were exposed to increasing concentrations of BCAA (4–12 mmol/L), capable of inducing pathological effects in MSUD patients [13] and cultured cancer cells [28,29]. In

PBMCs, BCAA significantly elicited NADPH oxidase activity and mitochondrial redox status (mitosox) with a maximal effect observed at 10 mmol/L after 1 h stimulation (Fig. 1A and B). Moreover, the time course experiments depicted an optimal time of 1 h for activation of both sources of superoxide by 10 mmol/L of BCAA (Fig. 1C and D).

In addition, we performed experiments in PBMCs to replicate the pro-inflammatory and hyperglycemic conditions which characterizes T2DM and other pathologies. For this purpose, PBMCs were exposed to a combination of high glucose (30 mmol/L) and pro-inflammatory cytokines (IL-6, 10^2 U/ml or TNF- α , 30 ng/ml). Under these harmful conditions, BCAA at a lower concentration of 0.5 mmol/L was able to enhance NADPH oxidase activity (Fig. 1E).

To demonstrate more specifically the $\text{O}_2^{\cdot-}$ production, high-performance liquid chromatography (HPLC) measurements were performed since this technique detects 2-hydroxyethidium (2-OH-E⁺), a specific product of DHE superoxide oxidation. The HPLC chromatogram of acetonitrile-extracted PBMCs showed both at the 2-OH-E⁺ and ethidium peaks. In BCAA-treated cells, for 1 h, a significant increase was observed in the 2-OH-E⁺ peak compared with controls (Fig. 1F). Treatment with the selective Nox1 and Nox2 pharmacological inhibitors ml-171 and gp91dstat, respectively, decreased BCAA-induced $\text{O}_2^{\cdot-}$ production (data not shown).

3.2. BCAA stimulate the PI3K/Akt-mTORC1 signalling pathway in PBMCs

Since very little is known about effects of BCAA on PBMCs, we next aimed to gain insight into the signalling pathways activated by BCAA upstream ROS formation. To evaluate whether BCAA could activate mTOR signalling, PBMCs were exposed to increasing concentrations of BCAA (0.2–12 mmol/L). mTOR activation was evaluated by the phosphorylation at Ser2448 (specific of mTORC1) (Fig. 2A). BCAA significantly induced mTORC1 phosphorylation in PBMCs with a maximal effect observed at 10 mmol/L after 1 h stimulation (Fig. 2A and C). However, when PBMCs were exposed to the pro-inflammatory and hyperglycemic conditions we noted that mTORC1 was phosphorylated at lower BCAA concentration (0.5 mmol/L) (Fig. 2B). Moreover, the time course experiments shown an optimal time of 1 h for mTORC1 phosphorylation by BCAA (10 mmol/L) (Fig. 2C), in accordance with previous reports in other type of cells [28,29].

Under these experimental conditions, BCAA-induced mTORC1 activation was similar to that achieved by a well-known inflammatory signal, LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 2D). PI3K/Akt pathway activation has been described as an upstream mTORC1 activator [21,30]. In PBMCs, BCAA promoted Akt phosphorylation with maximal response at 1 h (Fig. 2C and D), an effect that was shared by LPS (Fig. 2D). The mTOR inhibitor rapamycin prevented the activation of Akt (Fig. 2D) and abrogated mTORC1 activation (Fig. 2D) by both BCAA and LPS, as expected. At the same time, the Akt inhibitor wortmannin prevented the activation of mTORC1 by BCAA (Fig. 2E), suggesting a positive cross-activation between Akt and mTORC1 in PBMCs exposed to BCAA.

3.3. BCAA promote AMPK activation in PBMCs

The AMP-activated protein kinase (AMPK) is a key cellular energy sensor that may in turn regulate nutritional sensing [31]. Since the effects of high BCAA concentrations on AMPK are not defined, we investigated this pathway in PBMCs. BCAA were capable to increase time-dependent phosphorylation of AMPK (Thr172) from 5 min to 24 h with a maximal effect at 1 h (Fig. 3A). As AMPK has two residues of phosphorylation with opposite function (Thr172 activation and Ser485/491 inhibition) [31–33], we also explored whether BCAA act on Ser485/491. That residue was not affected by BCAA (10 mmol/L) (Fig. 3B), but insulin (used as positive control of Ser485/491 phosphorylation), alone or in combination with AICAR, as expected, induced Ser485/491 phosphorylation (Fig. 3B). In contrast, when we determined the Thr172 phosphorylation of AMPK, we noted that both AICAR

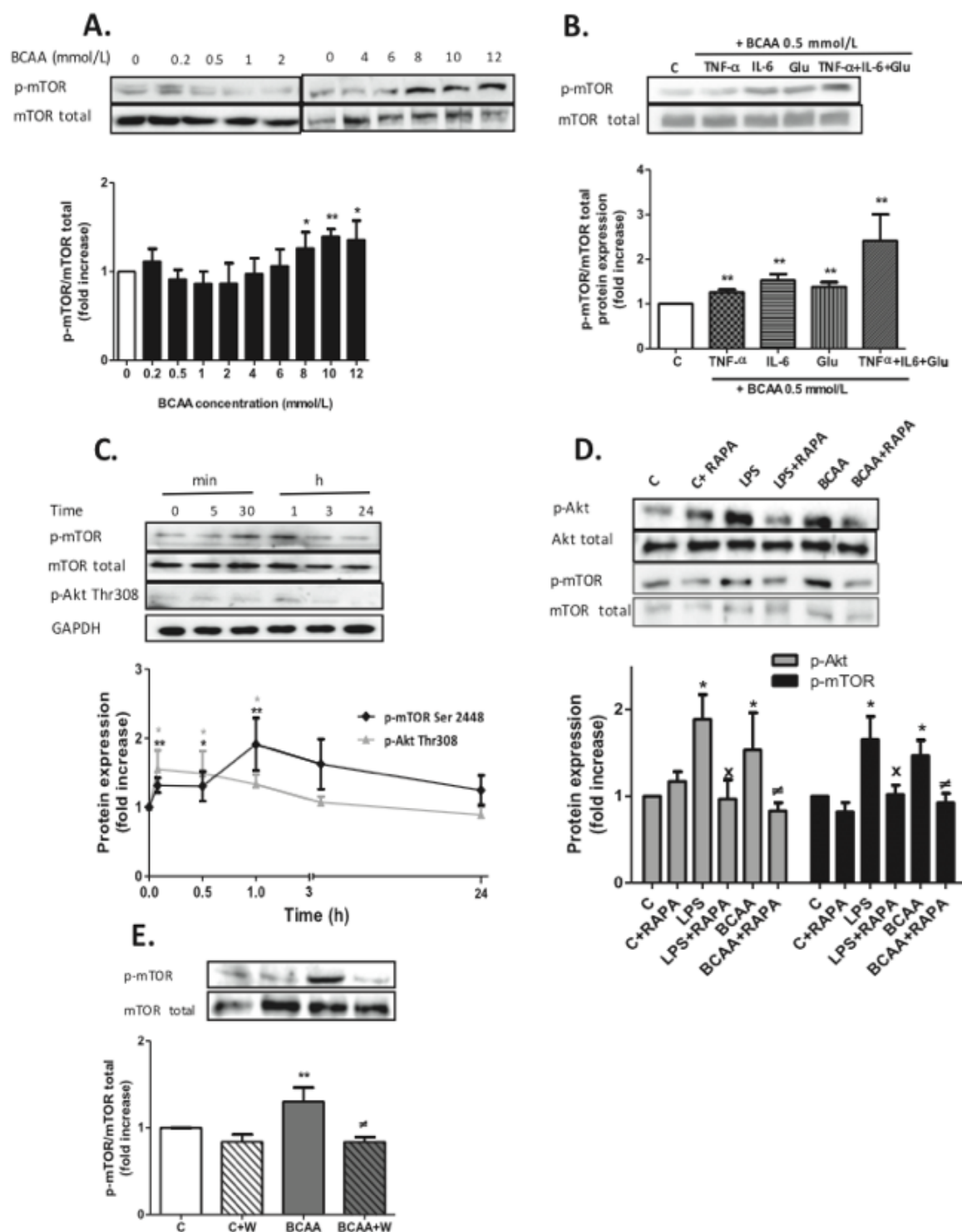


Fig. 2. BCAA activate the PI3K/Akt-mTORC1 axis in PBMCs. PBMCs were exposed to (A) increasing concentrations of BCAA (0.2–12 mmol/L) for 1 h (B) lower BCAA concentration (0.5 mmol/L) for 1 h with and without pro-inflammatory cytokines (IL-6, 10² U/ml or TNF- α , 30 ng/ml) and high glucose (30 mmol/L) (C) 10 mmol/L BCAA for increasing time periods (C) pre-incubated 30 min with mTORC1 inhibitor (rapamycin, 100 nmol/L) before stimulation with BCAA (10 mmol/L) or LPS (1 μ g/ml) for 1 h (D) pre-incubated 30 min with Akt inhibitor (wortmannin, 1 μ mol/L) before stimulation with BCAA (10 mmol/L, 1 h). mTOR, Akt or AMPK phosphorylated levels (p-mTOR or p-Akt respectively) were determined by western blot. p-mTOR, and p-Akt levels were obtained from densitometric analysis, as ratios versus corresponding total mTOR or Akt values, expressed as fold increase over control (considered 1). For each panel, representative blots are shown on the top. Data are expressed as mean \pm SEM. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs Control. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs BCAA. ^a*P* < 0.05 vs LPS. *n* = 4–7.

and BCAA, separately or in combination, induced that phosphorylation and therefore AMPK activation. The insulin did not change the Thr172 phosphorylation (Fig. 3B).

BCAA-induced AMPK activation was similar to that performed by AICAR (Figs. 3B and 3C). The obtained results confirm the differential phosphorylation of AMPK depending of residue on which act different stimuli.

Moreover, AICAR prevented the activation of mTORC1 and Akt elicited by BCAA (Fig. 3D), suggesting that the pharmacological over-activation of AMPK could act as an upstream negative regulator of the PI3K/Akt-mTORC1 axis activation. Contrary to that observed for Akt, the activation of AMPK by BCAA was rapamycin-insensitive and thus independent of mTORC1 (Fig. 3C).

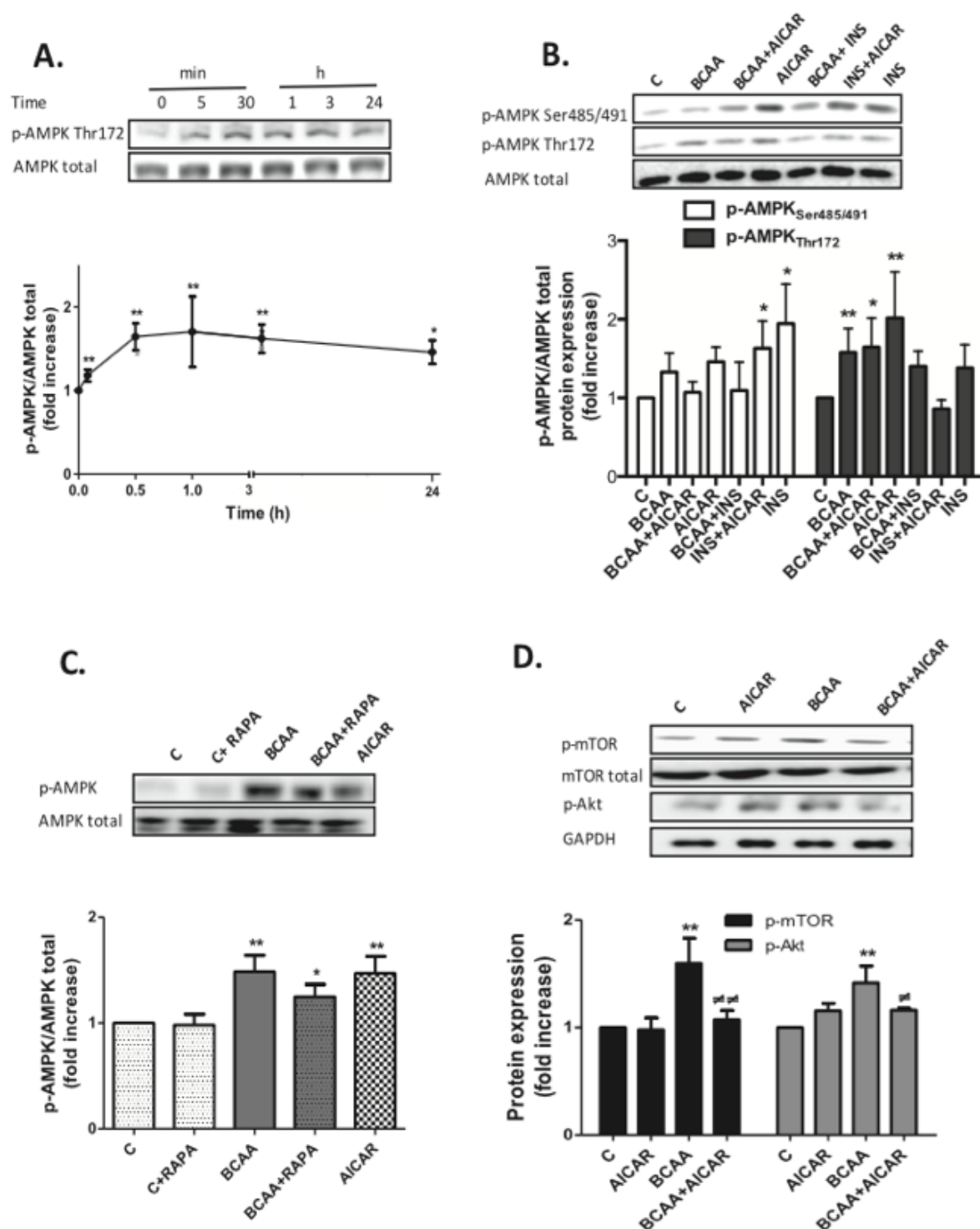


Fig. 3. BCAA activate AMPK axis and its inducer modulate Akt/TORC1 activation. PBMCs were incubated with (A) BCAA (10 mmol/L) for increasing time periods (B) BCAA (10 mmol/L) with or without AICAR (0.5 mmol/L) or insulin (1 nmol/L) for 1 h. (C) BCAA (10 mmol/L) with or without rapamycin (100 nmol/L) or AICAR (0.5 mmol/L) for 1 h. mTOR, Akt or AMPK phosphorylated levels were determined by western blot. p-mTOR, p-AMPK and p-Akt levels were obtained from densitometric analysis, as ratios versus corresponding total mTOR, AMPK or GAPDH values, expressed as fold increase over control (considered 1). For each panel, representative blots are shown on the top. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs BCAA. $n = 4-7$.

3.4. BCAA promote oxidative stress via PI3K/Akt-mTORC1

Next we investigated whether PI3K/Akt-mTOR and AMPK pathways could be implicated in the increased ROS production by BCAA. We observed that BCAA-elicited ROS were reduced by the mTORC1 inhibitor (rapamycin), the Akt inhibitor (wortmannin) and the AMPK activator (AICAR), suggesting that these pathways are upstream of ROS production (Fig. 4A, B and C). As NADPH oxidase was activated by BCAA we performed additional experiments to test which of its catalytic subunits participated in ROS production. The inhibition of

NOX-1 and NOX-2 subunits (both expressed in PBMCs) by their specific inhibitors (ML171 and gp91dstat, respectively) abrogated BCAA activated NADPH oxidase (Fig. 4A).

We tested whether additional signalling pathways were regulating the production of superoxide anions induced by BCAA in PBMCs. The activation of Nrf2 by sulforaphane allowed to eliminate both cellular sources of superoxide anions generation elicited by BCAA (Fig. 4B), similarly to that observed in the presence of ROS scavenger mito-TEMPO used as control (Fig. 4B).

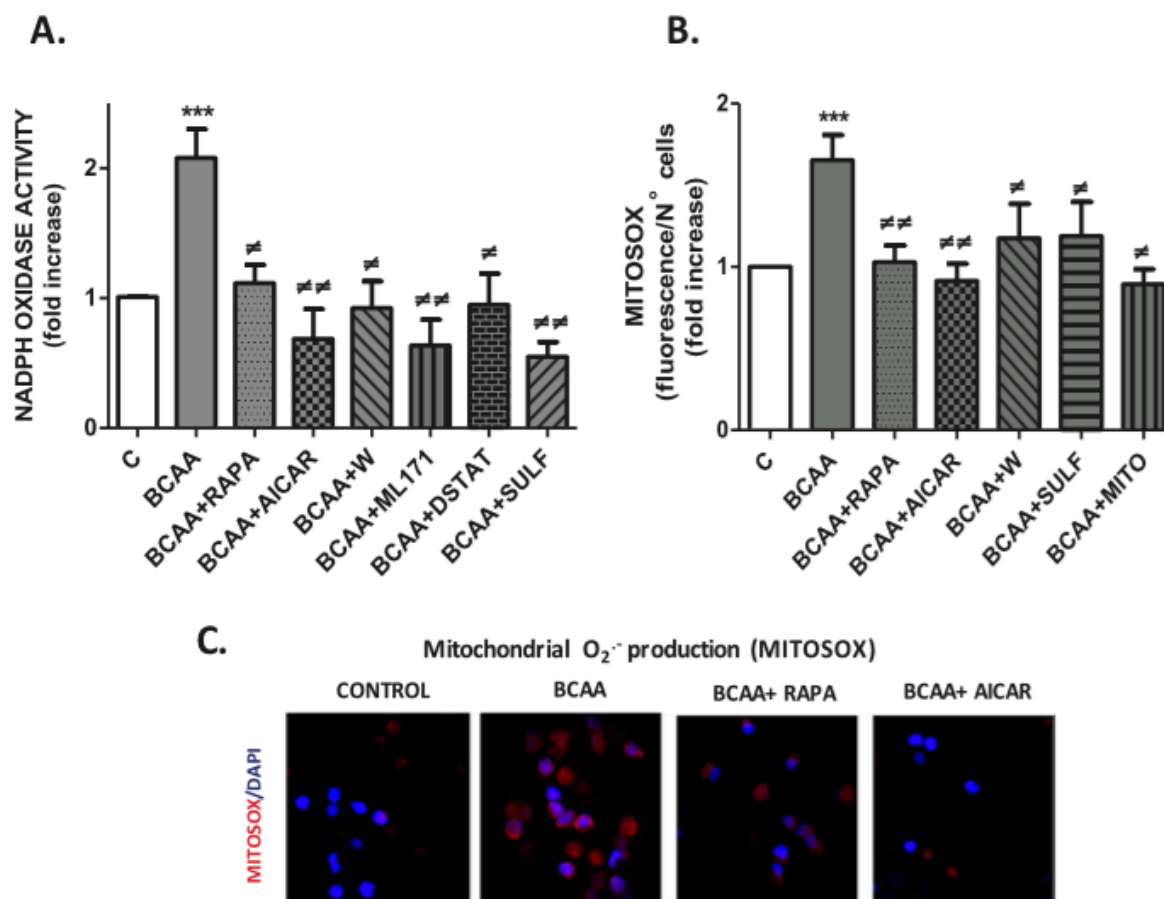


Fig. 4. BCAA induce ROS production via PI3K/Akt-mTORC1. Cells were pre-incubated different inhibitors rapamycin (100 nmol/L), AICAR (0.5 mmol/L), wortmannin (1 μ mol/L), ML171 (0.5 μ mol/L), gp130stat (5 μ mol/L), mito-TEMPO (0.5 μ mol/L) and sulforaphane (20 μ mol/L) for 30 min and effect of BCAA (10 mmol/L, 1 h) were investigated (A) on NADPH oxidase activity (B) mitochondrial O₂^{•-} was measured by fluorescence by plate luminometer. (C) Confocal microscopy showing O₂^{•-} production by Mitosox (red) and nuclei (blue). Data represent Z-stack of confocal images. Data are expressed as mean \pm SEM. *P < 0.05; **P < 0.01 ***P < 0.0005 vs Control. #P < 0.05 ##P < 0.005 vs BCAA. n = 5–7. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. BCAA cause mitochondrial dysfunction

Mitochondria is a major producer of ROS in mammalian cells [34], but also a main target for oxidative stress damage that may impair either the assembly or the function of the respiratory chain [34]. Such impairment allows further accumulation of ROS, thus resulting in a vicious cycle potentially leading to energy depletion and ultimately to cell death [35].

In this context, we determined the impact of BCAA on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m), used as a marker of mitochondrial dysfunction. BCAA induced depolarization of the mitochondrial membrane either in the whole PBMCs population or in each of the two PBMCs sub-populations, lymphocytes and monocytes (Fig. 5A and 5B). In all cases, the depolarization elicited by BCAA was prevented by the mTOR inhibitor (rapamycin) or by the AMPK activator (AICAR) (Fig. 5A and B). Moreover, BCAA reduced the levels of the uncoupling protein (UCP)-2, an inner membrane protein reported to limit the production of mitochondrial ROS [36] (Fig. 5C). This effect of BCAA on UCP-2 levels were equally prevented by both rapamycin and AICAR (Fig. 5C).

3.6. BCAA promote NF- κ B activation and the expression of pro-inflammatory genes

A positive relationship between oxidative stress generation and the activation of the pro-inflammatory NF- κ B pathway has been described in different clinical conditions [37]. One of the earliest events in NF- κ B pathway activation is the phosphorylation of p65 subunit [38]. We performed time course experiments of p65 phosphorylation in response

to 10 mmol/L of BCAA. We noted a time-dependent activation of p-p65 after 5 min which remained stable for up to 3 h being the optimal time at 1 h (Fig. 6A). As observed with LPS, BCAA augmented the phosphorylation of the p65 component of NF- κ B, as well as its nuclear translocation (Figs. 6B and C), without significantly affecting the p50 component (*data not shown*). To further investigate whether the activated and located into the nucleus p65 could directly interact with DNA, we performed a DNA binding assay. As shown the Fig. 6D, BCAA-treated cell presented, higher fluorescence intensity than untreated cells suggesting that BCAA could increase p65 DNA binding activity. The inhibition of mTORC1 by rapamycin and the activation of AMPK by AICAR prevented the effects of BCAA on p65 activation (Fig. 6B, C and 6D). Furthermore, the increased p65 expression elicited by BCAA was dependent on the generation of ROS since it was abolished in the presence of mito-TEMPO and DPI (NADPH oxidase inhibitor) (Fig. 6E).

Next we evaluated several pro-inflammatory genes regulated by the NF- κ B such as IL-6 and TNF- α (Fig. 7A and B), as well as membrane receptors such as CD40L and ICAM-1 that facilitate leukocyte adhesion and migration [39] (Fig. 7C and D).

The expression of these pro-inflammatory factors in response to BCAA was blocked by rapamycin and AICAR suggesting mTORC1 and AMPK pathway participation in that process (Fig. 7A to D).

3.7. BCAA promote PBMCs migration

To investigate the functional consequences of BCAA on PBMCs, we performed an *in vitro* chemotaxis assay. Incubation with BCAA for 1 h significantly stimulated PBMCs chemotaxis in comparison with control conditions, similarly to that observed in the presence of LPS (Fig. 7E).

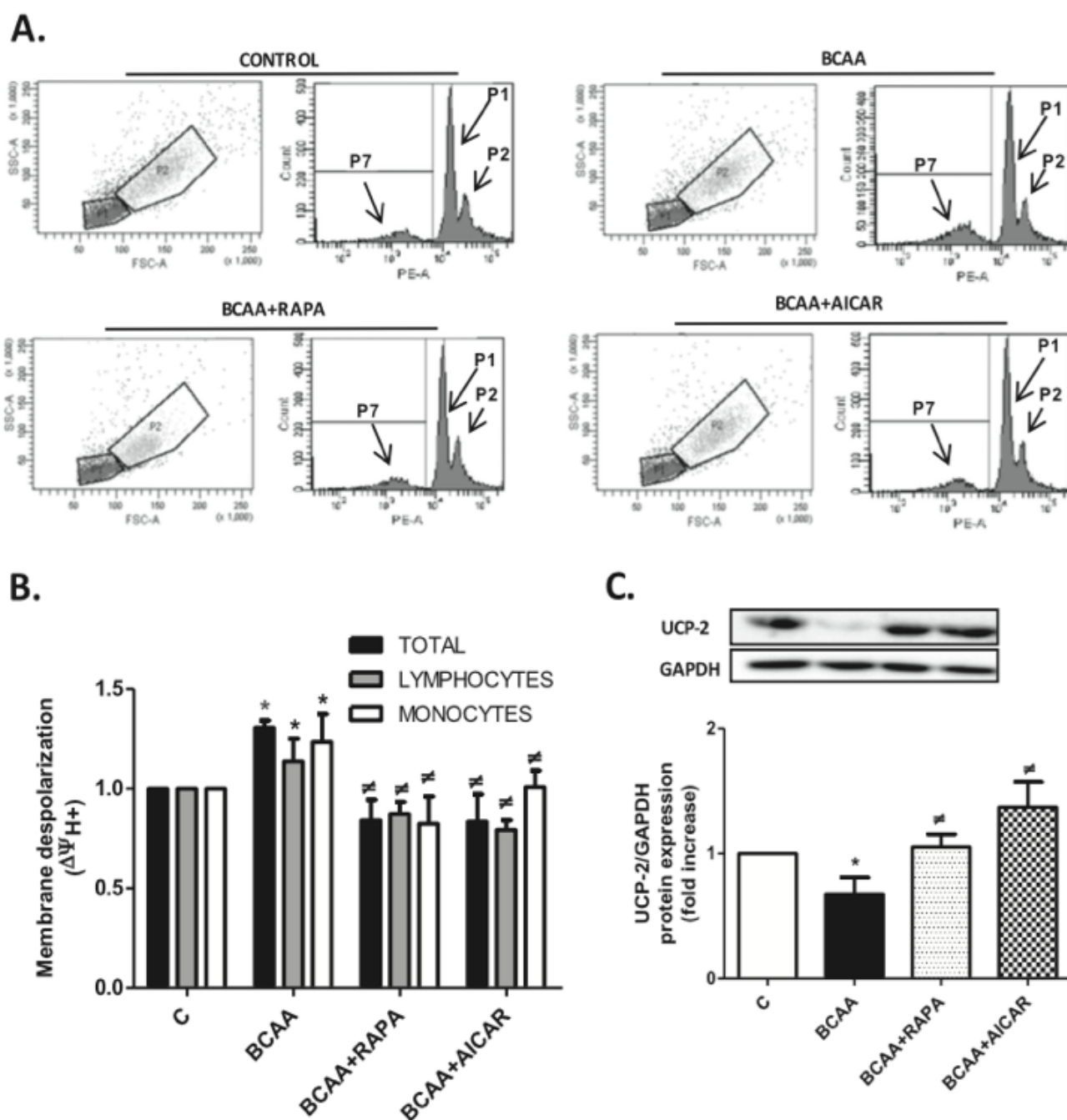


Fig. 5. Mitochondrial membrane potential measured by TMRM. PBMCs were incubated for 1 h with BCAA (10 mmol/L) and pre-incubated 30 min before with rapamycin (100 nmol/L) and AICAR (0.5 mmol/L) (A) One representative dot-plot and histograms is shown. P1 are lymphocytes, P2 monocytes and P7 are died cells. (B) a summarized bar graph showing depolarization of mitochondrial membrane (C) UCP-2 and GAPDH relative protein expression. The representative blots are shown on the top. The values were expressed as fold increase over control (considered 1). Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; vs Control. $^{\#}P < 0.05$ vs BCAA. $n = 5-6$.

The blockade of the Akt-mTORC1 axis by wortmannin and rapamycin as well as AMPK activation with AICAR abrogated the migration triggered by BCAA. Moreover, the inhibition of oxidative stress sources by DPI and mito-TEMPO or NF- κ B activation by BAY-11-7082 also abrogated BCAA-activated cell migration (Fig. 7E), suggesting the participation of oxidative stress and NF- κ B in this process.

3.8. BCAA induce the expression of antioxidant and anti-inflammatory defence proteins

Nrf2 is a transcription factor expressed in response to oxidant and inflammatory insults that maintains a tight cross-talk with other redox regulators of oxidative stress and inflammation, such as NF- κ B itself [40]. In PBMCs, we investigated whether BCAA did affect Nrf2 phosphorylation and its nuclear localization. BCAA increased Nrf2

protein phosphorylation (Fig. 8A), nuclear translocation (Fig. 8B) and binding to its DNA consensus sequence (Fig. 8C). Again, those effects of BCAA were dependent on mTORC1 and could be blunted through AMPK activation (Fig. 8A, B and C).

4. Discussion

The main finding of our work is that BCAA can directly trigger a mechanism that involves oxidative stress and NF- κ B activation in circulating PBMCs, and therefore these aminoacids could contribute to the inflammatory process observed in different pathological conditions.

Recent studies suggest that MSUD patients present, besides neurological damage, sustained inflammation and activation of the immune system [13], including elevated serum levels of IL-1 β , IL-6 and INF- γ .

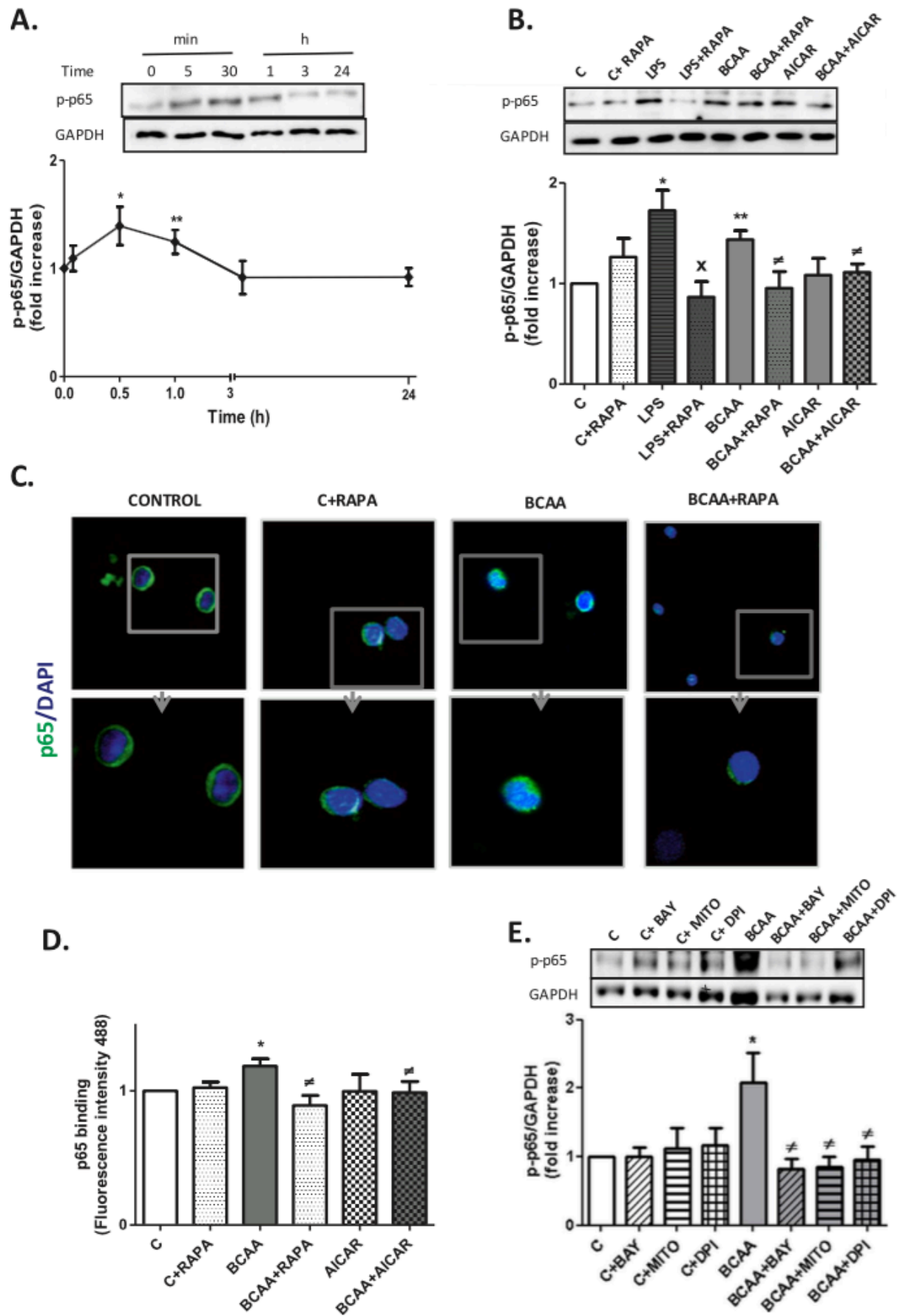


Fig. 6. BCAA activate NF- κ B pathway in PBMCs via mTORC1. Effect of BCAA 10 mmol/L on (A) p65 phosphorylation for increasing time periods (B) p65 phosphorylation for 1 h pre-incubated 30 min with rapamycin (100 nmol/L) and AICAR (0.5 mmol/L) (E) BAY-11-7082 (1 mmol/L), DPI (10 μ mol/L) and mito-tempo (0.5 μ mol/L) determined by Western blot. Representative blots are shown. (C) Immunocytochemical images revealed localization of p65 in nucleus (D) and increased DNA-binding activity of p65. Data are expressed as mean \pm SEM. *P < 0.05; **P < 0.01 vs Control. #P < 0.05 vs BCAA X P < 0.05 vs LPS used as positive control. n = 4–7.

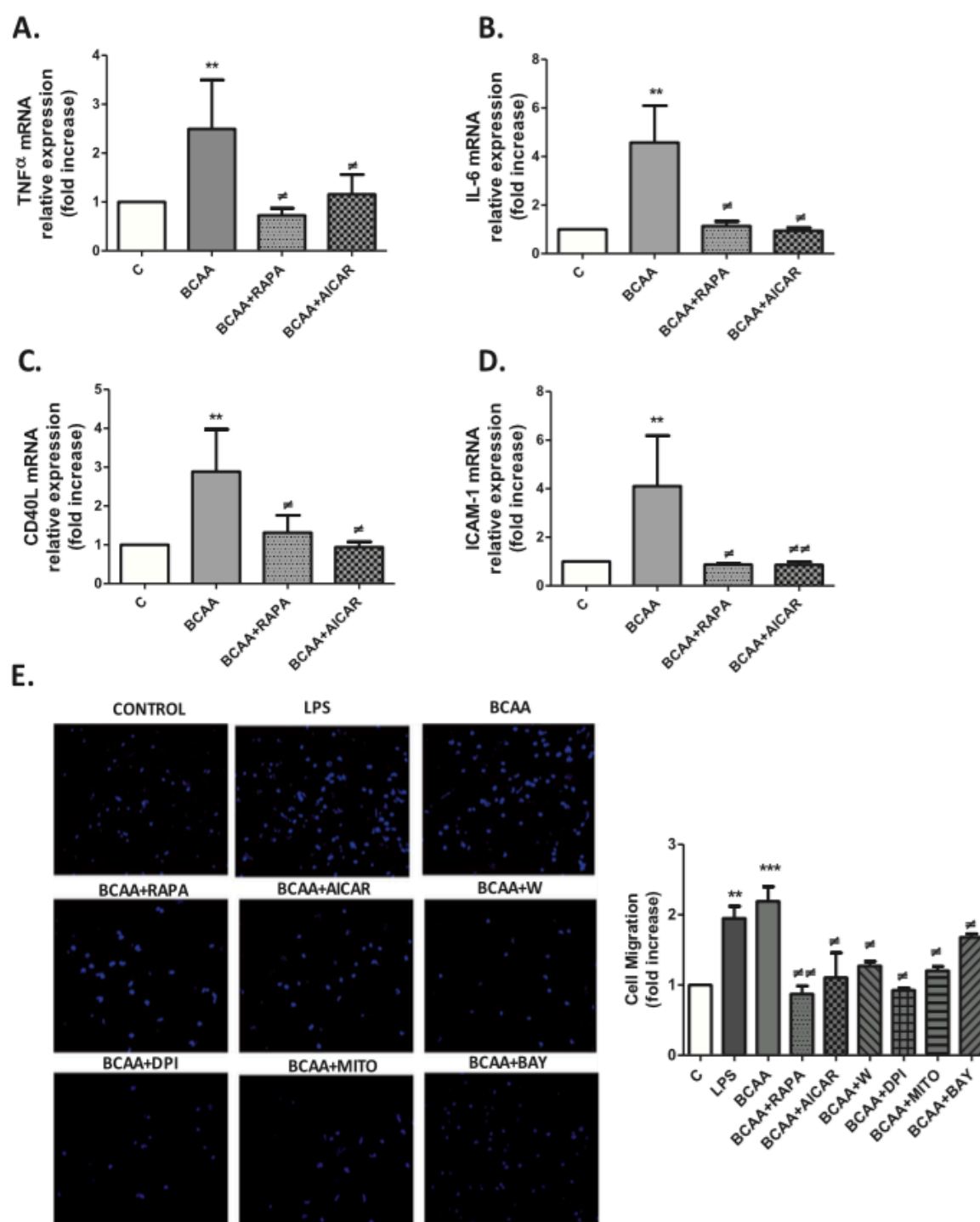


Fig. 7. BCAA induce NF κ B-dependent inflammatory genes and T cell activation and cell migration. Effect of BCAA (10 mmol/L, 1 h) with and without rapamycin and AICAR measured by RNAm levels in human PBMCs. (A) IL-6 (B) TNF α (C) CD40L and (D) ICAM-1. (E) BCAA chemotactic effect on PBMCs by transwell migration assay. Unstimulated cell (Control) or stimulated with LPS (as positive control) and BCAA for 1 h with or without rapamycin (RAPA), AICAR, wormannin (W), diphenyliodonium chloride (DPI), mito-TEMPO (MITO) and BAY-11-7082 (BAY). Data are expressed as mean \pm SEM. * P < 0.05; ** P < 0.01 or *** P < 0.005 vs Control. # P < 0.05 # P < 0.005 vs BCAA. n = 5–7.

Our results show that 10 mmol/L BCAA, at similar levels to those found in MSUD patients, could activate PBMCs inducing ROS production, activation of NF- κ B and related pro-inflammatory genes. These results could help to explain the changes observed in those patients.

Unbalanced ROS production is one of the most important mechanisms involved in different pathological conditions [41–43]. Among the major ROS sources are NADPH oxidase and mitochondria. In this report we reveal that BCAA triggered the formation of ROS in PBMCs through the activation of two catalytic subunits of NADPH oxidase (NOX-1 and NOX-2), whose expression is particularly important in immune cells [43]. In addition, BCAA augmented the production of mitochondria-

derived ROS, with a subsequent increase in oxidative damage and mitochondrial dysfunction. This mitochondrial dysfunction has been identified as a relevant mechanism in cardio-metabolic diseases, underlying cardiovascular risk factors such as diabetes, hypertension and atherosclerosis [44]. In PBMCs challenged with BCAA, the Nrf2-antioxidant response element signalling pathway became activated, probably as a mechanism to protect the cells against the excess ROS production [40].

Importantly, in this paper we have described for the first time to the best of our knowledge that BCAA activates the transcription factor NF- κ B in cells of the immune system. BCAA-induced NF- κ B activation was

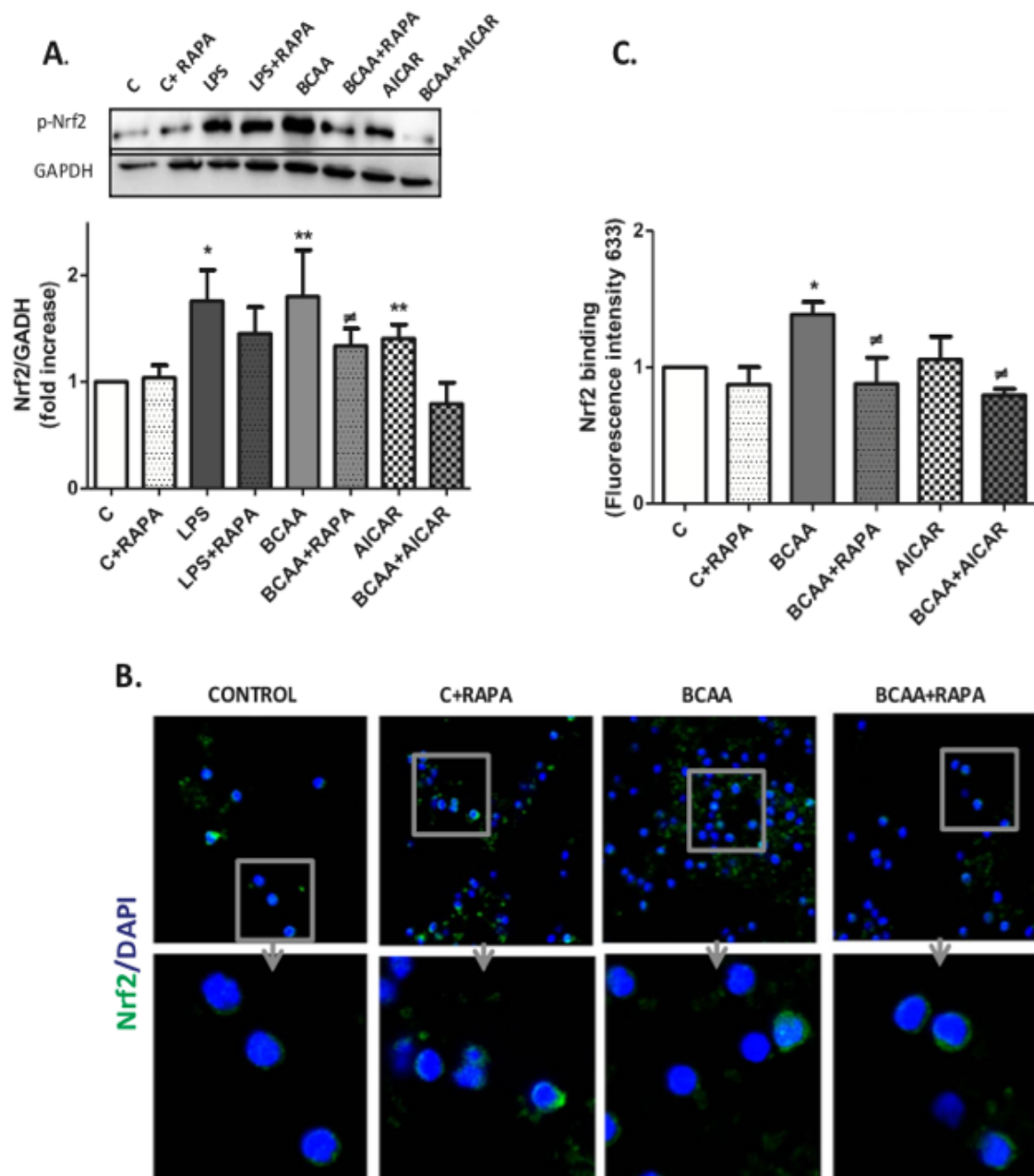


Fig. 8. BCAA induce Nrf2 independent of via mTORC1 activation and partially dependent AMPK activation. Effect of BCAA with and without rapamycin and AICAR in (A) protein expression of p-Nrf2 and GAPDH as loading control are also shown (B) Immunocytochemical images revealed localization of Nrf2 in nucleus. (C) and increased DNA-binding activity of Nrf2. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control. * $P < 0.05$ vs BCAA * $P < 0.05$ vs LPS used as positive control.

paralleled to over-expression of the pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 or TNF- α , whose circulating levels are found elevated in patients suffering MSUD [13]. BCAA also favoured the expression of CD40L and ICAM-1, which are proteins involved in the activation and the migration of PBMCs [39]. Functionally, the activation triggered by BCAA conferred a higher migration capacity of PBMCs. NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor [45]. Accordingly, the blockade of ROS generation prevented the activation of NF- κ B in PMBCs exposed to BCAA.

These oxidant and inflammatory BCAA effects were observed at concentrations that could be reached in MSUD [12,13] or in daily BCAA supplementation in sportmen [46], but higher than those found in patients suffering from obesity or diabetes [6,7,10,11]. However, chronic exposure to moderately elevated BCAA levels added to hyperglycaemia and pro-inflammatory conditions could decrease the threshold of mTOR phosphorylation and increase ROS formation. Thus, the potential harmful impact of BCAA may be particularly relevant in the context of a series of diseases characterized by oxidative stress and inflammation.

In fact, metabolomics studies has rekindled BCAA as a main metabolic signature associated with obesity in different populations [10,11,47]. BCAA positively correlate with body mass index in adult and pediatric individuals, while weight-reduction improves the BCAA profile [48–50]. Moreover, BCAA have been suggested as a major predictor of future diabetes [48] and blood levels correlated with cardio-metabolic complications, including insulin resistance [6,11].

In cancer cells, BCAA have proven to act as strong nutrient signals mainly acting via mTORC1 activation, a nutritional sensor that plays a key role in regulating cell growth, proliferation and migration [19–21]. We found that BCAA in PBMCs promoted the phosphorylation of mTOR at Ser2448. This effect was dependent on Akt, in line with that observed in other cell types [28,30]. Once activated at Ser2448, mTOR binds to Raptor, and other proteins to form the active enzyme complex mTORC1 which signals through the phosphorylation of downstream targets [21]. Reciprocally, we found that mTORC1 was able to modulate Akt activation, which suggests the existence of a cross-talk between both signalling molecules which needs further understanding. We also identified the pharmacological upstream activation of AMPK as a tool

to limit the formation of mTORC1 in response to BCAA. This is in line with previous studies in other cell types showing that AMPK can prevent mTORC1 activation [51]. Importantly, the effects of BCAA on oxidative stress generation, NF- κ B activation, inflammation-related protein expression and migration of PBMCs were blunted by rapamycin, which inhibits mTORC1 via binding to the FKBP12 domain [21]. This high lights the pivotal role of mTORC1 in mediating pro-oxidant and pro-inflammatory activation of PBMCs by BCAA. The over-activation of mTORC1 has been associated with the progression of the metabolic syndrome, future development of type 2 diabetes and different associated complications [52].

Besides the above described pathological conditions linked to BCAA increased levels, those aminoacids are commonly used as nutritional supplements potentially to improve mental and physical performance and with the purpose of muscle building [53]. Of interest, daily BCAA supplementation could reach elevated blood levels around 3–6 mmol/L concentrations as those used in our *in vitro* studies. The potential clinical implications of chronic BCAA supplementation is unknown. In non-obese healthy individuals a high BCAA intake at short term is well-tolerated, because of the BCKDC reserve capacity in the body and the fact that BCKDC is activated by excess substrate under normal conditions [54]. Surprisingly, only some acute toxicity studies have been carried out [55,56] and to our knowledge no toxicity effects at long term have been described in humans so far. Our studies point out on the importance of future studies about the oxidative and inflammatory effects of uncontrolled BCAA intake among sportsmen.

Ethics statement

The procedure was approved by the Research Ethics Committee of Instituto de Investigaciones Sanitarias Fundación Jiménez Díaz.

Funding information

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness/Health research fund FIS-FEDERPI14/00386. The laboratory of Renal, Vascular and Diabetic Research Laboratory is also supported also by grants from FIS-FEDER (PIE13/00051; PI14/0041); FP7 grant e-PREDICE and from the Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT)/Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica.

Author's contributions

O.Z., M.R.O and S.M. conceived the experiments and analysed data. O.Z., C.P., M.R.O and S.M. wrote the manuscript. O.Z. and E.C. performed the experiments and analysed data. M.S.S., C.V. and J.E. contributed to the discussion and reviewed and edited the manuscript.

Competing interests

No conflicts of interest relevant to this article were reported.

Acknowledgements

Olha Zhenyukh was the recipient of a fellowship from Fundación Conchita Rábago. The authors thank Enrique Bosch-Panadero, M^a de Mar Parreño and nurses from Blood bank of FJD for their technical assistance.

References

- [1] S. Bodoy, L. Martín, A. Zorzano, M. Palacin, R. Estevez, J. Bertran, Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 12002–12011.
- [2] T.R. Riggs, K.J. McKirahan, Action of insulin on transport of L-alanine into rat diaphragm *in vitro*. Evidence that the hormone affects only one neutral amino acid transport system, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 6450–6455.

- [3] E. Asor, S. Stempler, A. Avital, E. Klein, E. Rupp, D. Ben-Shachar, The role of branched chain amino acid and tryptophan metabolism in rat's behavioral diversity: intertwined peripheral and brain effects, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25 (10) (2015) 1695–1705.
- [4] J.D. Fernstrom, Branched-chain amino acids and brain function, *Am. Soc. Nutr. Sci.* 135 (2005) 1539S–1546S.
- [5] L. Hagenfeldt, S. Eriksson, J. Wahren, Influence of leucine on arterial concentrations and regional exchange of amino acids in healthy subjects, *Clin. Sci.* 59 (1980) 173–181.
- [6] P. Felig, E. Marliss, G.F. Cahill, Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity, *N. Engl. J. Med.* 281 (1969) 811–816.
- [7] S.A. Adibi, Influence of dietary deprivations on plasma concentration of free amino acids of man, *J. Appl. Physiol.* 25 (1968) 52–57.
- [8] M.M. Boulet, G. Chevrier, T. Grenier-Larouche, M. Pelletier, M. Nadeau, J. Scarpa, et al., Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309 (2015) E736–E746.
- [9] H. Nakamura, H. Jinzu, K. Nagao, Y. Noguchi, N. Shimba, H. Miyano, et al., Plasma amino acid profiles are associated with insulin, C-peptide and adiponectin levels in type 2 diabetic patients, *Nutr. Diabetes* 4 (2014) e133.
- [10] K.M. Huffman, S.H. Shah, R.D. Stevens, J.R. Bain, M. Muehlbauer, C.A. Slentz, et al., Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women, *Diabetes Care* 32 (2009) 1678–1683.
- [11] C.B. Newgard, J. An, J.R. Bain, M.J. Muehlbauer, R.D. Stevens, L.F. Lien, et al., A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance, *Cell Metab.* 9 (2009) 311–326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>.
- [12] B. Hoffmann, C. Helbling, P. Schadevold, U. Wendel, Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 17–20.
- [13] C.P. Mescka, G. Guerreiro, B. Donida, D. Marchetti, C.A. Wayhs, G.S. Ribas, A.S. Coitinho, M. Wajner, C.S. Dutra-Filho, C.R. Vargas, Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation, *Metab. Brain Dis.* 30 (2015) 1167–1174.
- [14] A.V. Contrucci, S. Paradisi, A. Matteucci, F. Malchiodi-Albedi, Branched-chain amino acids induce neurotoxicity in rat cortical culture, *Neurotox. Res.* 17 (2010) 392–398.
- [15] R. De Simone, F. Vissicchio, C. Mingarelli, C. De Nuccio, S. Visentin, M.A. Ajmone-Cat, L. Minghetti, Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1832 (2013) 650–659.
- [16] S.H. Neishabouri, S.M. Hutson, J. Davoodi, Chronic activation of mTOR complex 1 by branched chain amino acids and organ hypertrophy, *Amino Acids* 47 (2015) 1167–1182.
- [17] K.A. Liu, L.M. Lashinger, A.J. Rasmussen, S.D. Hursting, Leucine supplementation differentially enhances pancreatic cancer growth in lean and overweight mice, *Cancer Metab.* 2 (2014) 6.
- [18] T.J. Wang, M.G. Larson, R.S. Vasan, S. Cheng, E.P. Rhee, E. McCabe, et al., Metabolite profiles and the risk of developing diabetes, *Nat. Med.* 17 (2011) 448–453.
- [19] G.G. Chiang, R.T. Abraham, Targeting the mTOR signaling network in cancer, *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 433–442. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2007.08.001>.
- [20] H. Pópulo, J.M. Lopes, P. Soares, The mTOR signalling pathway in human cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 1886–1918.
- [21] Q. Yang, K.L. Guan, Expanding mTOR signaling, *Cell Res.* 17 (2007) 666–681.
- [22] R.M. Laberge, Y. Sun, A.V. Orjalo, C.K. Patil, A. Freund, L. Zhou, et al., mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 1049–1061.
- [23] M. Hernández-Presa, C. Bustos, M. Ortega, J. Tuñón, G. Renedo, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis, *Circulation* 95 (6) (1997) 1532–1541.
- [24] M. Kächele, A.M. Hennige, J. Machann, A. Hieronimus, A. Lamprinou, F. Machicao, et al., Variation in the phosphoinositide 3-kinase gamma gene affects plasma HDL-cholesterol without modification of metabolic or inflammatory markers, *PLoS One* (2015).
- [25] L. Vidarte, C. Pastor, S. Mas, A.B. Blázquez, V. de los Ríos, R. Guerrero, et al., Serine 132 is the C3 covalent attachment point on the CH1 domain of human IgG1, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38217–38223.
- [26] S. Vallejo, E. Palacios, T. Romacho, L. Villalobos, C. Peiró, C.F. Sánchez-Ferrer, The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cardiovasc. Diabetol.* 13 (2014) 158.
- [27] J.J.L. Li, H.M. Chen, M. Li, D. Hua, Z. Hong Lu, J. Ke Wang, An optimized assay for transcription factor NF- κ B with dsDNA-coupled microplate, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 55 (2007) 31–37.
- [28] P.P. Gran, D. Cameron-Smith, The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes, *BMC Physiol.* 11 (2011) 10.
- [29] M. Honda, K. Takehana, A. Sakai, Y. Tagata, T. Shirasaki, S. Nishitani, T. Muramatsu, T. Yamashita, Y. Nakamoto, E. Mizukoshi, Y. Sakai, T. Yamashita, M. Nakamura, T. Shimakami, M. Yi, S.M. Lemon, T. Suzuki, T. Wakita, Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C, *Gastroenterology* 141 (1) (2011) 128–140.
- [30] R.M. Memmott, P.A. Dennis, Akt-dependent and -independent mechanisms of

- mTOR regulation in cancer, *Cell Signal.* 21 (2009) 656–664.
- [31] K.A. Coughlan, R.J. Valentine, N.B. Ruderman, A.K. Saha, Nutrient Excess in AMPK Downregulation and Insulin Resistance, *J. Endocrinol. Diabetes Obes.* 1 (2013) 1008.
 - [32] R.J. Valentine, K.A. Coughlan, N.B. Ruderman, Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser^{485/491} through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle, *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (562) (2014) 62–69.
 - [33] A. Zarfeshani, S. Ngo, A.M. Sheppard, Leucine alters hepatic glucose/lipid homeostasis via the myostatin-AMP-activated protein kinase pathway - potential implications for nonalcoholic fatty liver disease, *Clin. Epigenet.* 6 (2014) 27. <http://dx.doi.org/10.1186/1868-7083-6-27>.
 - [34] H. Nohl, D. Hegner, Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?, *Eur. J. Biochem.* 82 (1978) 563–567.
 - [35] M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, B.N. Ames, Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10771–10778.
 - [36] M.C. Saleh, M.B. Wheeler, C.B. Chan, Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator, *Diabetologia* 45 (2002) 174–187.
 - [37] C. Li, Y. Wang, Q. Qiu, T. Shi, Y. Wu, J. Han, et al., Qishenyiqi protects ligation-induced left ventricular remodeling by attenuating inflammation and fibrosis via STAT3 and NF- κ B signaling pathway, *PLoS One* (2014).
 - [38] M. Alique, E. Civantos, E. Sanchez-Lopez, C. Lavez, S. Rayego-Mateos, R. Rodriguez-Diez, A.B. Garcia-Redondo, J. Egido, A. Ortiz, D. Rodriguez-Puyol, M. Ruiz-Ortega, Integrin-linked kinase plays a key role in the regulation of angiotensin II-induced renal inflammation, *Clin. Sci.* 127 (1) (2014) 19–31.
 - [39] D. Urban, U. Thanabalasingam, D. Stibenz, J. Kaufmann, H. Meyborg, E. Fleck, et al., CD40/CD40L interaction induces E-selectin dependent leukocyte adhesion to human endothelial cells and inhibits endothelial cell migration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404 (2011) 448–452.
 - [40] N. Wakabayashi, S.L. Slocum, J.J. Skoko, S. Shin, T.W. Kensler, When NRF2 talks, who's listening?, *Antioxid. Redox Signal.* 1 (2010) 1649–1663.
 - [41] M. Khan, F. Hassan, S. Roy, C.K. Sen, Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular disease, *Hypertension* 49 (4) (2014) 359–370.
 - [42] P.R. Angelova, A.Y. Abramov, Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology, *Free Radic. Biol. Med.* (16) (2016) 30293–30293.
 - [43] G.R. Drummond, S. Selemidis, K.K. Griendling, C.G. Sobey, Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (6) (2011) 453–471.
 - [44] F. Di Lisa, N. Kaludercic, A. Carpi, R. Menab, M. Giorgio, Mitochondria and vascular pathology, in: *Pharmacol. Reports*, 61(1) (2009)123–30.
 - [45] Y.M. Janssen-Heininger, M.E. Poynter, P.A. Baeuerle, Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1317–1327.
 - [46] M. Gleeson, Interrelationship between physical activity and branched-chain amino acids, *Am. Soc. Nutr. Sci.* 135 (2005) 1591S–1595SS.
 - [47] P. Würtz, V.P. Mäkinen, P. Soininen, A.J. Kangas, T. Tukiainen, J. Kettunen, et al., Metabolic signatures of insulin resistance in 7098 young adults, *Diabetes* 61 (2012) 1372–1380.
 - [48] W. Perng, M.W. Gillman, A.F. Fleisch, R.D. Michalek, S.M. Watkins, E. Isganaitis, et al., Metabolomic profiles and childhood obesity, *Obesity* 22 (2014) 2570–2578.
 - [49] L.P. Svetkey, V.J. Stevens, P.J. Brantley, L.J. Appel, J.F. Hollis, C.M. Loria, et al., Comparison of strategies for sustaining weight loss: the weight loss maintenance randomized controlled trial, *J. Am. Med. Assoc.* 299 (2008) 1139–1148.
 - [50] C. Morris, C. O'Grada, M. Ryan, H.M. Roche, M.J. Gibney, E.R. Gibney, et al., The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids, *Proc. Nutr. Soc.* 71 (2012) 634–638.
 - [51] S. Agarwal, C.M. Bell, S.B. Rothbart, R.G. Moran, AMP-activated Protein Kinase (AMPK) control of mTORC1 is p53- and TSC2-independent in Pemetrexed-treated Carcinoma Cells, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 27476–27486.
 - [52] W. Lieberthal, J.S. Levine, Mammalian target of rapamycin and the kidney. II. Pathophysiology and therapeutic implications, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 303 (2) (2012) F180–F191.
 - [53] V.F. Cruzat, M. Krause, P. Newsholme, Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise, *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 11 (2014) 61.
 - [54] R.A. Harris, M. Joshi, N.H. Jeoung, M. Obayashi, Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism, *J. Nutr.* 135 (2005) 1527S–1530SS.
 - [55] P.B. Pencharz, R. Elango, R.O. Ball, Determination of the tolerable upper intake level of leucine in adult men, *J. Nutr.* 142 (2012) 2220S–2224S.
 - [56] B. Rasmussen, E. Gilbert, A. Turki, K. Madden, R. Elango, Determination of the safety of leucine supplementation in healthy elderly men, *Amino Acids* 48 (7) (2016) 1707–1716.